ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1981 N° 59

DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA LEUCOSE BOVINE : MISE AU POINT D'UN ANTIGENE POUR LA TECHNIQUE DE L'IMMUNODIFFUSION, APPLICATIONS

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE
(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

GAUTHIER Thierry
Né, le 18 Août 1954 à PARIS (16 éme)

MEMBRES DU JURY

Président	MM.	Le Professeur MONNIER Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse
Assesseur		Le Professeur TOURNUT Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Assesseur		Le Professeur CABANIE Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

COREP ASSISTANCE
21, rue Viguerie
31300 TOULOUSE
Tél. (61) 42.01.19

Nous remercions le

Laboratoire Cogla

et

l'Institut Ronchèse

pour leur participation à cette thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543924_0017

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1981 N° 59

DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA LEUCOSE BOVINE : MISE AU POINT D'UN ANTIGENE POUR LA TECHNIQUE DE L'IMMUNODIFFUSION, APPLICATIONS

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE
(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

GAUTHIER Thierry
Né, le 18 Août 1954 à PARIS (16 éme)

MEMBRES DU JURY

Président	MM.	Le Professeur MONNIER Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse
Assesseur		Le Professeur TOURNUT Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Assesseur		Le Professeur CABANIE Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

COREP ASSISTANCE
21, rue Viguerie
31300 TOULOUSE
Tél. (61) 42.01.19

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	M. LAUTIE
Directeurs honoraires	MM. PONS FLORIO
Professeurs honoraires	MM. BRIZARD BERTHELON SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire	M. GODFRAIN
Professeur sans chaire	Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire	M. RICO
Professeur sans chaire	M. BRAUN
Maître Assistant	M. BENARD

Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologique et Médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire	M. PAVAUX
Maître Assistant	M. LIGNEREUX
Maître Assistant	M. SAUTET

Anatomie Descriptive - Extérieur - Anatomie Appliquée - Tératologie

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire	M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire	M. FARGEAS
Maître Assistant Agrégé	M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie et Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire	M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans Chaire	M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé	M. MAGNOL

Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire	M. LABIE
Maître de Conférences	M. EECKHOUTTE
Maître Assistant Agrégé	Mme BENARD

Hygiène - Inspection - Contrôle et Technologie
des denrées alimentaires d'origine animale

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire	M. DORCHIES
Maître de Conférences	M. FRANC
Maître Assistant	M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Parasitologie externe - Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES

Professeur titulaire	M. LESCURE
Maître de Conférences	M. GUELFI
Maître-Assistant	REGNIER

Sémiologie et pathologie médicale des équidés et carnivores
Législation vétérinaire et Déontologie clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire	M. TOURNUT
Maître de Conférences	M. BEZILLE
Maître Assistant	M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour
Clinique - Clinique ambulatoire

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire	M. CAZIEUX
Maître Assistant Agrégé	M. GENEVOIS
Maître Assistant	M. AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale - Technique Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire	M. FERNEY
Professeur sans chaire	M. ROYAL
Maître Assistant Agrégé	M. TAINTURIER

Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction
Obstétrique - Clinique

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire	M. CHANTAL
Maître de Conférences	M. GANIERE
Maître Assistant	PICAVET

Maladies contagieuses - Zoonoses - Législation Sanitaire

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire	M. LAUTIE
Maître Assistant	M. PELLERIN

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ECONOMIE RURALE

Professeur titulaire	M. QUEINNEC
Professeur sans chaire	DARRE
Maître Assistant	Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène générale - Zootechnie - Elevage
Economie Générale et des productions animales

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire	M. FALIU
Professeur sans chaire	M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie- Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs : ANGELIER, ARMENGAUD, AUVERGNAT, BLANC, BOURBON, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET, LE BIHAN, MAZENC, RIVES.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A mes proches

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur MONNIER

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter
la présidence de notre Jury de Thèse.

Hommages très respectueux

A notre Jury de Thèse,

Monsieur le Professeur TOURNUT
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Nous lui exprimons notre sincère reconnaissance pour l'aide qu'il nous a toujours accordée.

Monsieur le Professeur CABANIE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a fait le plaisir d'accepter de faire partie de notre Jury de Thèse.

A Monsieur le Docteur B. GUILLEMAIN, grâce à qui ce travail a pu s'accomplir, nous lui sommes particulièrement reconnaissant de nous avoir initié à la Virologie.

A tous ceux qui ont apporté leur concours pour ce travail,

Monsieur le Docteur J.F. DUPLAN
Monsieur le Docteur A. BOUSICAUX
Monsieur le Docteur J.J. QUESNEL
Mademoiselle Th. ASTIER
Monsieur R. MAMOUN
Madame N. JAULIN
L'ensemble du personnel de l'Unité INSERM de la Fondation Bergonié à Bordeaux.

INTRODUCTION

I. 1ère partie : METHODES UTILISEES EN LABORATOIRE POUR LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA LEUCOSE BOVINE.

A. DESCRIPTION DES TECHNIQUES

1 - LA METHODE HEMATOLOGIQUE

2 - L'IMMUNOFLUORESCENCE

3 - LA FIXATION DU COMPLEMENT

4 - L'IMMUNODIFFUSION EN GELOSE

5 - L'ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE

6 - LE TEST D'INHIBITION DE LA POLYCARYOCYTOSE PRECOCE

B. PERFORMANCES RELATIVES DES DIFFERENTES TECHNIQUES

1 - LA METHODE HEMATOLOGIQUE

2 - L'IMMUNOFLUORESCENCE

3 - LA FIXATION DU COMPLEMENT

4 - L'IMMUNODIFFUSION EN GELOSE

5 - L'ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE

6 - LE TEST D'INHIBITION DE LA POLYCARYOCYTOSE PRECOCE

II. 2ème partie : MISE AU POINT D'UN ANTIGENE DE DIAGNOSTIC POUR LA TECHNIQUE DE L'IMMUNODIFFUSION ; ENQUETES SEROEPIDEMIOLOGIQUES.

A. MATERIEL ET METHODES

1 - CULTURES CELLULAIRES

2 - ANTIGENE BLV POUR LE TEST D'IMMUNODIFFUSION EN GELOSE

3 - TEST D'IMMUNODIFFUSION (ID)

4 - SERUMS

5 - TEST D'INHIBITION DE LA POLYCARYOCYTOSE PRECOCE (EPI)

6 - ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE (RIA p24 et RIA gp)

7 - ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE DE COMPETITION

8 - ANALYSE STATISTIQUE

B. RESULTATS

1 - RESULTATS OBTENUS AVEC UN ANTIGENE COMMERCIAL

2 - MISE AU POINT D'UN TEST D'IMMUNODIFFUSION

3 - SENSIBILITE DU TEST D'IMMUNODIFFUSION

4 - RESULTATS COMPARATIFS OBTENUS DANS UNE ENQUETE SEROEPIDEMIOLOGIQUE PAR LES TESTS EPI et ID.

III. 3ème partie : CONCLUSION - DISCUSSION

La leucose bovine (ou leucémie ou lymphosarcome) est une maladie des tissus lymphopoiétiques. La phase tumorale est souvent précédée d'un état de lymphocytose persistante (LP) généralement considéré comme une forme préclinique de la maladie.

Habituellement, les bovins atteints présentent un état de fatigue générale et une perte progressive de poids. Consécutivement, apparaît un phénomène d'hypertrophie ganglionnaire généralisé ou non. Il s'agit d'une prolifération de cellules tumorales qui peut infiltrer des organes tels que le thymus (forme rare et plus souvent chez les jeunes animaux (Dungworth et al, 1964), le foie, la caillette, la rate, le coeur..., les lésions cardiaques pouvant entraîner précocement la mort de l'animal. Les études antérieures ont montré l'existence de deux éventualités épidémiologiques : une forme enzootique fréquente et une forme sporadique. Dans le cas de leucose enzootique, la maladie apparaît généralement de façon répétée dans certaines régions et dans les mêmes troupeaux. Bendixen (1963) au Danemark a remarqué la très haute incidence de l'affection dans certains troupeaux des îles Sjaelland et Loland-Falster. En France, et particulièrement dans la région de Mont-de-Marsan où l'incidence moyenne de la maladie est très importante (1×10^{-3}), 25 % de l'effectif de certains troupeaux et parfois plus, est atteint (statistique des services vétérinaires). En ce qui concerne la leucose sporadique, la maladie atteint soit des jeunes (lymphosarcome juvénile, lymphosarcome thymique), soit des animaux de tout âge (lymphosarcome généralisé, leucose cutanée).

Dans les cas de formes enzootiques, des expériences récentes ont montré qu'il existait une association entre présence d'un virus de type C dans les cultures de lymphocytes de bovins, et leucose ou lymphocytose persistante (LP) (Miller et al, 1969 ; Dutta et al, 1970 ; Kawakami et al, 1970). A la suite de cette constatation, l'hypothèse selon

laquelle le virus observé représenterait l'agent étiologique de la maladie fut émise, la dénomination BLV (virus leucémogène bovin) fut attribuée dès avant sa confirmation.

Il est à remarquer que le virus n'a jamais été mis en évidence dans les tissus normaux ou tumoraux, et dans les sécrétions analysées de bovins atteints (de leucose) (Van Der Maaten et Miller, 1978). Cependant la culture in vitro des lymphocytes de ces bovins permet de le révéler.

Le BLV appartient au groupe des rétrovirus responsables de leucémies ou de sarcomes chez d'autres mammifères tels, la souris, le chat, le cobaye et certains primates. Il possède un acide ribonucléique qui représente 1 à 2 % de la masse virale totale ; il possède en outre une DNA polymérase-RNA dépendante ou reverse transcriptase pour laquelle à l'inverse des autres rétrovirus de type C, les ions Mg^{++} sont nécessaires à l'activité enzymatique. Les protéines de structure constituent 60 à 70 % de la masse virale. L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide révèle l'existence de polypeptides viraux dont les poids moléculaires sont compris entre 11.000 et 51.000 (Deshayes et al, 1977) : les composants majeurs sont une protéine interne du virion de poids moléculaire 24.000 (p24) et une glycoprotéine d'enveloppe de poids moléculaire 51.000 (gp51). L'existence de ces protéines est importante car certaines méthodes sérologiques de diagnostic de la leucose bovine utilisent ces antigènes ou les anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux infectés.

Suite à l'infection virale, on peut observer :

- l'apparition d'anticorps anti-BLV,
- une perturbation sanguine (lymphocytose persistante),
- le développement de tumeurs (lymphosarcomes).

Ces trois formes se succèdent le plus souvent et sont d'inégale fréquence : la grande majorité des animaux infectés par le virus ou ayant

eu un contact avec celui-ci réagissent par la production d'anticorps ; un pourcentage notable d'animaux présente une lymphocytose persistante. Enfin le lymphosarcome survient chez un très faible pourcentage d'animaux.

Les résultats rapportés par Van der Maaten et al. (1974), Van der Maaten et Miller (1976) suggèrent que le BLV se réplique préférentiellement in vitro, dans des cellules hétérologues (virus xénotrope). C'est la raison pour laquelle de nombreux laboratoires ont utilisé de telles cellules comme support de la production du BLV. On doit à Miller et à Van der Maaten la mise au point d'une lignée de cellules de rein d'embryon de mouton infectées par le BLV produit par des lymphocytes de bovins (FLK-BLV). Cette lignée cellulaire hautement productrice de virus est largement utilisée dans l'élaboration d'antigènes en vue de réactions sérologiques.

Lorsque ces cellules ou des cellules lymphocytaires bovines infectées par le BLV sont cocultivées avec des cellules homologues ou hétérologues, on peut observer un effet cytopathogène syncytial (Cornefert-Jensen et al, 1969). En particulier, on peut observer un effet syncytial précoce (24 heures), lors de la coculture de cellules FLK-BLV et de cellules de chat infectées par le virus du sarcome murin (CC81) (Irgens et al, 1977). Cet effet cytopathogène est inhibé de façon spécifique par des sérums de bovins porteurs d'anticorps anti BLV. Le test d'inhibition de la polycaryocytose précoce (EPI) élaboré par Guillemain et al.(1978-A) sur la base de l'inhibition des syncytia permet d'apprécier de façon quantitative la teneur du sérum en anticorps dirigés contre le BLV.

Il existe d'autres méthodes utilisant les réponses hématologiques ou immunologiques à l'infection virale notamment :

- le diagnostic hématologique de la lymphocytose persistante ; il permit à Bendixen l'instauration d'une prophylaxie sanitaire de la

maladie dès 1959 au Danemark (Bendixen, 1973).

- l'immunodiffusion en gélose (ID) : elle utilise le plus souvent une solution antigénique contenant la glycoprotéine virale gp51 (ID gp) qui est mise en présence des sérums à tester (Miller et Olson, 1972).

- l'immunofluorescence permet de déceler les anticorps dirigés contre un ou plusieurs antigènes situés dans le cytoplasme des cellules productrices de BLV et notamment la p24 (Ferrer et al, 1972).

- la fixation du complément permet de déceler les anticorps dirigés contre plusieurs antigènes viraux. L'antigène provient du surnageant de culture cellulaire productrice de BLV (Miller et Van der Maaten, 1974 ; Levy et al, 1975).

- le Radioimmunoassai (RIA) permet d'évaluer de façon quantitative la teneur d'un sérum en anticorps dirigés soit contre la p24 soit contre la gp (Devare et al, 1976-1977). En raison de sa simplicité, la méthode d'immunodiffusion en gélose est une technique applicable au dépistage à grande échelle d'animaux infectés. C'est une des raisons pour laquelle un groupe d'experts réunis en Août 1977 à Rotterdam (Ressang et al, 1978) a retenu parmi d'autres la méthode IDgp pour le diagnostic de la leucose dans le cadre des échanges de bovins au sein des pays du marché commun.

Le but de ce travail est d'étudier particulièrement l'immunodiffusion en gélose. Cette technique sera très amplement détaillée. Sa sensibilité et sa fiabilité seront testées et comparées à celles que fournissent les différentes méthodes utilisées pour le diagnostic de la maladie.

On pourra envisager une prophylaxie visant à l'éradication du BLV des cheptels infectés.

Ière partie

I - METHODES UTILISEES EN LABORATOIRE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA LEUCOSE BOVINE

Cet exposé sera présenté en deux parties : dans la première on s'attachera à décrire les techniques de laboratoire, utilisées pour le diagnostic de la leucose bovine, dans la seconde leurs performances seront comparées.

A. DESCRIPTION DES TECHNIQUES

De nombreuses techniques ont été élaborées, parmi celles-ci nous retiendrons par ordre chronologique :

- la méthode hématologique, l'immunofluorescence, la fixation du complément, l'immunodiffusion en gélose, le test radioimmunologique et enfin le test EPI.

1 - LA METHODE HEMATOLOGIQUE a été la première utilisée pour le diagnostic de la leucose bovine. Elle est basée sur la détection d'une perturbation sanguine : la lymphocytose persistante.

En effet, cette perturbation est généralement considérée comme une manifestation préclinique de la leucose tumorale bovine.

BENDIXEN au Danemark utilisa cette assomption et entreprit un contrôle hématologique systématique des bovins adultes de son pays. Il utilisa une "clef hématologique" ou "guide d'évaluation de la leucose" permettant la détection d'animaux potentiellement leucémiques (tableau 1). Il put établir ainsi une très bonne corrélation entre données hématologiques et données épidémiologiques (tableau 2). En effet l'hématologie permet de distinguer 3 catégories de troupeaux : les troupeaux indemnes de leucose, les troupeaux à leucose sporadique, les troupeaux à leucose

TABLEAU 1

CLEF HEMATOLOGIQUE UTILISEE AU DANEMARK

(Bendixen, 1959)

Age (années)	Lymphocytes par mm^3 de sang		
	Normal	Suspect	Positif
0 - 1	moins de 10 000	10 000 - 12 000	plus de 12 000
1 - 2	moins de 9 000	9 000 - 11 000	plus de 11 000
2 - 3	moins de 7 500	7 500 - 9 500	plus de 9 500
3 - 4	moins de 6 500	6 500 - 8 500	plus de 8 500
Plus de 4	moins de 5 000	5 000 - 7 000	plus de 7 000

TABLEAU 2

RESULTATS D'UNE ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE EFFECTUEE AU DANEMARK[1]

Type de troupeau	Nombre de troupeaux examinés	Nombre d'animaux examinés	Résultat de la numération lymphocytaire (pourcentage d'animaux par catégorie)		
			Normal	Suspect	Lymphocytosique
Indemne de leucose	188	4 736	96,2	3,5	0,3
Un cas de leucose juvénile[2]	104	2 083	97,4	2,4	0,2
Un cas de leucose cutanée[2]	32	453	94,8	4,9	0,3
Un cas de leucose tumorale de l'adulte[3]	85	1 909	67,5	8,6	23,9
Deux ou plusieurs cas de leucose tumorale de l'adulte[3]	127	6 051	59,3	10,7	30

1 D'aprés Bendixen (Crespeau, 1975).

2 Forme sporadique de la maladie.

3 Forme enzootique de la maladie.

enzootique.

Les animaux appartenant aux deux premières catégories de troupeaux présentent une image hématologique normale ; par contre ceux de la 3ème catégorie sont dans une proportion importante suspects ou présentent une lymphocytose persistante.

Se fondant sur ces résultats, un programme d'éradication a été mis en vigueur au Danemark. Il prévoit la mise en oeuvre d'examens hématologiques réguliers dans les troupeaux à leucose tumorale et la mise en observation des troupeaux ayant été en contact avec eux. Les animaux décelés positifs ou l'ensemble de l'effectif atteint sont abattus.

Selon le même schéma, d'autres pays se sont intéressés à l'éradication de la leucose bovine. Des programmes proches de celui appliqué au Danemark, mais cependant moins sévères furent élaborés. Ils utilisent des clefs hématologiques voisines de celles de BENDIXEN (GOETZE, RFA ; GOTTINGEN, RFA ; WUSTERHAUSEN, RDA ; RADEMACHER et KRAUS, Tchécoslovaquie ; d'URSS). Pour des raisons évidentes de simplification, une clef européenne (C.E.E.) fut établie (Tableau 3).

2 - LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE (IF) a été largement éprouvée par Ferrer et al. (1972). Elle révèle dans les sérums bovins l'existence d'anticorps dirigés contre un ou plusieurs antigènes situés dans le cytoplasme de cellules productrices de BLV. Elle permet aussi de déceler les cellules infectées par le BLV provenant de bovins atteints de leucose et maintenus en culture à court terme ou sous forme de lignée continue.

Cette méthode utilise en outre des gammaglobulines bovines spécifiques de l'infection par le BLV couplées à l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) ou des immunoglobulines caprines dirigées contre les immunoglobulines bovines couplées au FITC.

TABLEAU 3

CLEF HEMATOLOGIQUE C.E.E.

Age (années)	Lymphocytes par mm^3 de sang		
	Normal	Suspect	Lymphocytosique
0 - 1	moins de 11 000	11 000 - 13 000	plus de 13 000
1 - 2	moins de 10 000	10 000 - 12 000	plus de 12 000
2 - 3	moins de 8 500	8 500 - 10 500	plus de 10 500
3 - 4	moins de 7 500	7 500 - 9 500	plus de 9 500
4 - 5	moins de 6 500	6 500 - 8 500	plus de 8 500
5 - 6	moins de 6 000	6 000 - 8 000	plus de 8 000
plus de 6	moins de 5 500	5 500 - 7 500	plus de 7 000

Trois principes ont été utilisés :

- la méthode d'IF directe,
- la méthode d'IF indirecte,
- la méthode du "blocking experiment".

La première méthode permet de mettre en évidence les antigènes viraux contenus dans les cellules infectées : celles-ci sont fixées, puis soumises aux gammaglobulines bovines anti BLV, couplées au FITC.

La seconde méthode permet d'apprécier la teneur de sérums bovins en anticorps dirigés contre le BLV. Les cellules infectées par le virus sont fixées, puis mises en présence de dilutions croissantes du sérum à tester ; le complexe fluorescent dirigé contre les immunoglobulines bovines est alors ajouté et se fixe sur l'éventuel couple immun AG-AC.

Notons que cette méthode permet comme la première de révéler l'infection d'une cellule par le BLV en utilisant des sérums porteurs d'anticorps dirigés contre lui et par l'adjonction du composé fluorescent.

Enfin, la dernière méthode dite du "Blocking experiment" prouve la spécificité de la réaction immunologique. Les cellules infectées et fixées sont mises en présence de sérums à tester puis le composé fluorescent comportant l'immunoglobuline spécifique du BLV est ajouté. Seuls les sérums négatifs permettent l'observation d'une fluorescence.

3 - LA METHODE DE FIXATION DU COMPLEMENT (FC) décrite par Miller et Van der Maaten (1974) a été amplement expérimentée par la suite (Levy et al. (1975) ; Hoff-Jørgensen et Eskildsen, (1976). Les anticorps détectés sont dirigés aussi bien contre la glycoprotéine que contre les protéines internes du virion. L'antigène de référence est le milieu de culture

d'une cellule produisant le BLV.

Le système hémolytique : 100 % de complément de cobaye est additionné de 5 % de sérum normal de veau (un facteur présent dans ce sérum est nécessaire à la fixation du complément de cobaye sur certains complexes immuns formés par les anticorps bovins et les antigènes homologues).

Le mélange "antigène-anticorps-complément" est incubé. On ajoute alors des globules rouges de mouton préalablement sensibilisés par un sérum antiérythrocytaire de mouton. Après incubation et centrifugation, le titre est évalué (réciproque de la dilution limite du sérum empêchant 50 % de l'hémolyse).

4 - LA METHODE D'IMMUNODIFFUSION EN GELOSE (ID), technique simple, permet de déceler la présence d'anticorps dirigés contre certaines protéines du BLV (Miller et Olson, 1972).

L'immunoprécipitation en agar est pratiquée selon Ouchterlouny. L'antigène et le sérum diffusent au sein de la gélose ; il se crée dès lors des gradients de concentration pour chaque réactif ; lorsque le rapport des concentrations relatives de l'antigène et de l'anticorps est optimal, la précipitation apparaît sous forme d'une ligne nette au sein du gel.

Puisque les systèmes précipitent selon un rapport de concentration Antigène-Anticorps bien déterminé pour chacun d'eux, toutes les zones de précipitation distinctes correspondent à des systèmes immunologiques distincts. Ainsi lorsque la solution antigénique contenant les deux protéines majeures du BLV est mise en présence d'un sérum possédant les anticorps dirigés contre ces polypeptides, deux arcs de précipitation apparaissent au sein du gel.

En pratique, on utilise indifféremment ou conjointement les antigènes p24 et gp51 ; ils proviennent de cultures productrices de BLV,

soit des cultures à court terme de lymphocytes provenant de bovins malades (Mammerickx et al, 1976), soit des cultures de cellules FLK-BLV (Miller et Van der Maaten, 1976).

Dans une certaine mesure, l'immunodiffusion peut être également utilisée pour le titrage d'immunsérums en fonction de la position relative de l'arc de précipitation.

5 - L'ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE (RIA)

Mis au point par Yallow et Bersons (1960) au tout début de l'utilisation des antigènes radioactifs, il permet de quantifier les antigènes viraux ou leurs anticorps spécifiques.

En ce qui concerne le BLV, les protéines virales p24 ou gp51 sont marquées avec de l'iode (^{125}I ou ^{131}I).

Deux méthodes sont couramment utilisées pour cette iodination : l'iodination par l'iodogène, il permet le marquage radioactif de la glycoprotéine virale gp51 (Devare et Stephenson, 1977), et la méthode utilisant la chloramine T pour la p24 (Greenwood et al, 1963).

Après la réaction antigène-anticorps du sérum de bovin, le complexe ^{125}IAg-Ac est précipité. Deux techniques sont utilisées :

- soit la précipitation à l'aide d'un antisérum dirigé contre les immunoglobulines bovines.

- soit la précipitation à l'aide de la protéine A du staphylocoque doré (Kessler, 1975).

Il est ainsi possible :

- soit de détecter dans des sérums bovins les anticorps dirigés contre les protéines du BLV.

- soit de détecter les antigènes viraux ; on utilise alors la compétition se produisant entre les antigènes radioactifs et les antigènes non marqués vis-à-vis d'un sérum de référence.

6 - LE TEST D'INHIBITION DE LA POLYCARYOCYTOSE PRECOCE (EPI)

Ce test a été élaboré par Guillemain et al.(1978-A) ; ces auteurs ont démontré la spécificité du phénomène de polycaryocytose précoce (24 heures) survenant dans les cultures mixtes de cellules ovines productrices de BLV (FLK-BLV) et de cellules félines infectées par le virus du sarcome murin (CC81) :

- Le phénomène de polycaryocytose est observé à chaque fois que des cellules FLK-BLV sont cocultivées avec des cellules CC81 et une seule cellule FLK-BLV suffit pour obtenir un syncytium (l'effet inducteur de syncytia est observé avec toute cellule produisant du BLV, telles que les lymphocytes de bovins leucémiques ou lymphocytosiques).

- Le phénomène cytopathogène est inhibé de façon spécifique par l'addition au milieu de culture de sérums de bovins infectés par le BLV ou d'anticorps purifiés.

Le test EPI repose sur ce phénomène d'inhibition, et l'utilisation de dilutions sériées de sérums à tester permet la détermination d'un titre. Ce titre est exprimé comme l'inverse de la dilution qui provoque une diminution de 50 % du nombre de syncytia par référence aux cultures non traitées (SID_{50}).

Deux méthodes ont été utilisées pour la titrage des sérums. La méthode "complète" qui nécessite le comptage minutieux des syncytia formés dans les cultures mixtes FLK-BLV-CC81 et la méthode simplifiée, ne demandant qu'une estimation approximative. La méthode "complète" a été employée dans un nombre important de cas afin de s'assurer de la fiabilité

du test EPI ; cependant son emploi est limité en raison de la nécessité de comptage rigoureux des syncytia dans des cultures incubées avec une gamme étendue de dilutions de sérums à tester. Or dans les examens de routine, où une très grande précision n'est pas requise, la méthode simplifiée peut être appliquée avec de bons résultats.

Ce test à la fois simple et quantitatif offre la possibilité de larges enquêtes séroépidémiologiques.

B. PERFORMANCES RELATIVES DES DIFFERENTES TECHNIQUES

Les études menées au cours de ces dernières années ont montré que, suite à l'infection par le BLV, l'animal développait une réponse immunitaire contre le virus. Les différentes techniques de diagnostic de l'infection par le virus de la leucose bovine citées précédemment sont basées sur les images sérologiques ou hématologiques des bovins malades.

1 - LA METHODE HEMATOLOGIQUE

L'efficacité de la méthode hématologique a été confirmée par la mise en oeuvre d'un plan d'éradication de la leucose au Danemark (Bendixen, 1973). Dans ce plan incluant, rappelons-le, la détection de la lymphocytose persistante et l'abattage des animaux "positifs", l'incidence de la forme tumorale de la maladie de l'adulte a chuté de façon encourageante : en effet, de 6×10^{-5} en 1969, elle n'atteignait plus que $1,5 \times 10^{-5}$ en 1973. En l'espace de quatre ans en Allemagne Fédérale, une prophylaxie sanitaire similaire permit de réduire des 2/3 le nombre des troupeaux "positifs" (au moins un cas tumoral) et dans la même proportion le nombre des animaux atteints de lymphosarcome (Schmidt et Hasse, 1968).

Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle la lymphocytose persistante est une forme préclinique de la leucose tumorale bovine. Il faut cependant remarquer qu'à la suite du programme sanitaire danois, aucune régression du nombre d'animaux présentant la forme sporadique de la leucose tumorale bovine n'a été enregistrée. Cet "échec" semble indiquer que l'étiologie de la leucose dite sporadique diffère de celle de l'affection tumorale enzootique bovine ; dans cette dernière le BLV est toujours présent et l'état de lymphocytose est le plus souvent rencontré ; dans le cas de la forme sporadique de la maladie au contraire, il n'a jamais été possible de déceler ce virus et il est rare d'observer

un état de lymphocytose persistante.

Les études menées par Straub et al. (1978) ont montré l'importance des problèmes techniques rencontrés pour la réalisation des numérations sanguines ; il semblerait qu'une standardisation satisfaisante pour déterminer le nombre des leucocytes ne soit pas possible, malgrè l'unité de méthode et l'étalonnage soigneux des appareils de comptage.

Il faut encore ajouter que l'état de lymphocytose persistante peut avoir des origines différentes (Driscoll et Olson, 1977).

Les résultats fournis par les méthodes sérologiques de diagnostic de l'infection par le BLV permettent d'apprécier la valeur du test hématologique.

2 - LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE (IF) est une méthode sensible ; Ferrer et al. (1974), en effet étudiant simultanément les réponses sérologiques de bovins à l'infection par le BLV et les lymphocytes de ceux-ci en microscopie électronique, ont établi que 90 % des animaux positifs par l'IF sont porteurs du virus. A l'inverse, aucun virus n'a été détecté chez des animaux sérologiquement négatifs.

L'IF est une méthode spécifique du BLV ou de ses anticorps ; Ferrer et al. (1972) ont observé à l'aide de la technique directe :

- l'absence de fluorescence des cellules lymphocytaires provenant de bovins normaux et non infectés.

- l'absence de fluorescence de cellules productrices de virus lorsqu'elles sont mises en présence de sérums de bovins non infectés.

La spécificité a encore été démontrée par Ressang et al. (1974) à l'aide de la méthode indirecte ; ces auteurs n'ont pu observer dans les sérums bovins les anticorps spécifiques d'autres virus, tel celui de la "diarrhée bovine" dite à virus, tel le Parainfluenza III, le virus syncy-

cial bovin et celui de Maedi-visna.

Ferrer et al. (1972) ont montré d'autre part, par des recherches comparées en fluorescence, que les antigènes du BLV ne croisent pas avec ceux d'oncornavirus d'autres mammifères.

Enfin ces auteurs (1974) utilisant la clef de Bendixen ont comparé les résultats obtenus par la méthode hématologique et par l'immunofluorescence. Ils ont observé une bonne corrélation ; cependant un certain nombre d'animaux (jusqu'à parfois 76 %) provenant de troupeaux "à cas unique ou multiple de leucose tumorale" et indemnes de lymphocytose sont reconnus positifs par l'IF.

Ces résultats montrent que l'état de lymphocytose est trop inconstant pour être utilisé en tant que révélateur de l'état d'infection. Ainsi la spécificité et la sensibilité de l'IF rendent cette technique intéressante pour le diagnostic de l'infection par le virus de la leucose bovine.

En pratique cependant elle reste peu utilisée en raison de difficultés de lecture, d'interprétation des résultats faiblement positifs et de la nécessité d'entretenir une culture cellulaire.

Notons que les anticorps décelés par cette méthode sont dirigés contre certaines protéines virales situées dans le cytoplasme des cellules infectées, notamment la p24.

3 - LA FIXATION DU COMPLEMENT (FC)

Les études entreprises par Miller et Van der Maaten (1974) ont permis de montrer que cette méthode est sensible et d'utilisation pratique.

Les anticorps décelés par la FC sont dirigés contre les protéines internes du virion (notamment la p24) et contre la glycoprotéine

d'enveloppe (gp51).

Dans une étude portant sur 17 troupeaux, Levy et al. (1975) ont détecté la présence d'anticorps chez la totalité des animaux atteints de lymphosarcome. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par l'IF ; cependant la méthode de fixation du complément n'a pas permis de déceler des anticorps chez les jeunes animaux présentant la forme sporadique de la leucose tumorale, le BLV n'a jamais pu être mis en évidence chez de tels bovins. Par ailleurs, les troupeaux indemnes de leucose n'ont pas présenté d'animaux positifs, résultat en accord avec l'hématologie. Enfin, dans les troupeaux ayant présenté un ou plusieurs cas de leucose tumorale, on observe une corrélation entre le nombre d'animaux sérologiquement positifs et la présence de lymphocytose. Cependant, des discordances apparaissent chez certains animaux, certains en effet développent une réponse immunitaire en l'absence de lymphocytose, d'autres présentent un état de lymphocytose mais sont sérologiquement négatifs. Une infection récente n'ayant pas encore provoqué de perturbation hématologique ou un état de résistance individuelle à l'infection virale ou encore une faible infection par le BLV pourraient expliquer le 1er cas (sérologie positive sans lymphocytose). Le deuxième cas (lymphocytose et sérologie négative) peut avoir lieu en l'absence d'infection par le BLV. Enfin la FC pourrait ne pas être assez sensible pour déceler une faible réponse immunitaire. Il apparaît néanmoins que la FC est aussi sensible que l'IF et plus sensible que l'hématologie en tant que méthode de dépistage des animaux infectés par le BLV.

Malheureusement l'activité anticomplémentaire de certains sérums ne permet pas actuellement une automatisation.

4 - L'IMMUNODIFFUSION EN GELOSE (ID)

L'ID a été étudiée par de très nombreux auteurs (Miller et Olson, 1972 ; Olson et al, 1973 ; Paulsen et al, 1973, 1975 ; Baumgartener et al, 1975 ; Mammerickx et al, 1976-A) qui l'on comparée aux précédentes techniques de diagnostic de la leucose bovine : hématologie - IF - FC. Dans une première période, la protéine interne virale, p24, a été utilisée comme antigène. Miller et Olson en 1972 ont montré l'existence d'une corrélation entre une sérologie positive par l'ID et un état de lymphocytose persistante. Mammerickx et al. (1976) ont noté cependant des discordances entre les deux techniques. Il semble donc, ici encore, que l'état de lymphocytose soit trop inconstant pour être utilisé en tant que révélateur de l'état d'infection.

Ferrer et al. (1972) ont comparé la technique d'immunofluorescence à celle de l'immunodiffusion (utilisant la p24) ; ils ont montré que cette dernière est moins sensible et incapable de déceler la présence d'anticorps dans 75 % des sérums ayant donné une réaction faiblement positive en IF. Des recherches en vue de l'identification de la glycoprotéine virale ont donc été entreprises. Son identification amena la réalisation de tests comparatifs utilisant les uns l'antigène p24, les autres la glycoprotéine (gp51) ; le tableau ci-dessous montre que la glycoprotéine utilisée comme antigène donne de meilleurs résultats que la p24 pour la détection sérologique de bovins infectés par le BLV.

Détection des animaux réagissant en ID avec l'antigène p24 ou l'antigène gp51

Antigène utilisé	Nombre d'animaux positifs	Nombre d'animaux suspects	Nombre d'animaux négatifs
p24	64	11	42
gp51	103	1	13

(D'après Miller et Van der Maaten, 1976)

Dès lors, de nombreuses études séroépidémiologiques sur l'état d'infection par le BLV ont eu lieu dans différents pays en utilisant l'ID gp :

Crespeau et al. (1978) ont réalisé une enquête dans la région des Landes, réputée à haute incidence de leucose, leurs résultats révèlent des taux d'infection moyens voisins de 26 % des animaux, soit approximativement 60 % des troupeaux ; d'autre part, le recensement des cas de leucose tumorale apparus durant cette enquête, permet d'évaluer le risque tumoral annuel chez les animaux infectés à 4 ‰.

Il semble donc que la méthode d'ID utilisant une préparation antigénique contenant la glycoprotéine et la protéine interne p24 soit une excellente technique pour le dépistage des animaux infectés dans les enquêtes de masse ; elle peut d'ailleurs être appliquée sur les extraits d'organes prélevés à l'abattoir (Schmidt et al., 1976). Notons qu'il existe cependant certains inconvénients inhérents à l'ID : aspect fasti-

dieux de la manipulation et impossibilité d'automatisation.

5 - L'ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE (RIA)

Le RIA diffère des méthodes décrites précédemment par sa haute sensibilité. Cependant il demeure relativement peu utilisé en raison de contraintes techniques.

Initialement, cette méthode a été employée pour détecter les anticorps dirigés contre la protéine interne p24 (Devare et al, 1976 ; Mc Donald et Ferrer, 1976 ; Levy et al, 1977-A).Cette technique étant quantitative, elle a permis de révéler une augmentation régulière du taux d'anticorps suivant la progression de l'infection marquée par une lymphocytose croissante. Les titres les plus élevés étant rencontrés chez les animaux présentant un lymphosarcome (Levy et al, 1977-A).

Par la suite, une méthode radioimmunologique utilisant l'antigène gp51 a été mise au point. Elle est quantitative et l'on observe de la même façon une augmentation régulière du taux d'anticorps suivant la progression de l'infection.

Le RIA par sa sensibilité et sa spécificité devrait être utilisé pour des enquêtes séroépidémiologiques de masse ; cependant, la difficulté d'obtention de grandes quantités d'antigène purifié et le coût d'une telle opération ne rendent pas actuellement possible son utilisation à grande échelle. Il devrait par contre être appliqué aux études ponctuelles, à visée scientifique et éventuellement aux cas douteux révélés par d'autres méthodes.

6 - LE TEST D'INHIBITION DE LA POLYCARYOCYTOSE PRECOCE (EPI)

L'EPI est une réaction immunologique dépendant des anticorps contenus dans les sérums des bovins infectés par le BLV. Ceux-ci appartiennent à la classe des IgG1 ; le complément ou l'Interferon n'interviennent pas dans cette réaction. L'état actuel des connaissances ne permet pas de préciser vers qu'elles protéines virales sont dirigés les anticorps inhibant la réaction cytopathogène ; Guillemain et al. (1978-A)ont standardisé le test EPI. L'utilisation d'une méthode simplifiée dont les résultats sont voisins de ceux fournis par la méthode complète fait appel à une appréciation visuelle et rapide du nombre des syncytia. Elle a permis la réalisation d'enquêtes séroépidémiologiques (Guillemain et al. 1978).

Une enquête menée par ces auteurs dans une région à haute incidence de leucose, montre que l'infection par le BLV est observée chez toutes les catégories d'animaux où pour des raisons hématologiques, cliniques ou épidémiologiques, il est logique de la suspecter :

- bovins adultes leucémiques:100 % d'infection
- bovins à lymphocytose persistante:100 % d'infection
- animaux normaux mais vivant au contact d'animaux infectés: 97 % d'infection.

Au contraire, aucun animal provenant de troupeaux indemnes de leucémie et de lymphocytose persistante (et ceci depuis 5 ans au moins) ne s'est révélé positif.

Le titre moyen des sérums varie très significativement selon le statut de l'animal :

- ceux correspondant aux animaux présentant un lymphosarcome de l'adulte (LSA) ou une lymphocytose persistante (LP) sont les plus élevés

(977 et 104 respectivement).

- les titres sont plus faibles et comparables chez les animaux normaux "contact" et dans quelques cas de lymphosarcome juvénile (LSJ) de type sporadique (28 et 16 respectivement).

Les résultats positifs concernant la leucémie juvénile sporadique (résultats systématiquement négatifs par l'emploi des autres techniques sérologiques), suggèrent que le test EPI détecte en plus des anticorps dirigés contre le BLV, des anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux. Dans cette hypothèse les antigènes tumoraux induits par le BLV et ceux présents dans les cas de leucose sporadique donneraient lieu à des réactions croisées.

Rappelons pour conclure, que les réponses hématologiques ou sérologiques mises en évidence par les méthodes décrites précédemment représentent un marqueur de l'infection par le virus leucémogène bovin (leur intensité allant le plus souvent avec la sévérité de la maladie) mais elles sont certainement sans corrélation avec une éventuelle réponse immunitaire antitumorale.

IIème Partie

MISE AU POINT D'UN ANTIGENE DE DIAGNOSTIC POUR LA TECHNIQUE DE L'IMMUNODIFFUSION ; ENQUETES SEROEPIDEMIOLOGIQUES

A. MATERIELS ET METHODES

1 - CULTURES CELLULAIRES

Les cultures cellulaires sont utilisées pour la production des antigènes viraux (cellules FLK-BLV) et pour la réalisation du test EPI (cellules CC81).

Les cellules embryonnaires de rein de mouton infectées chroniquement par le virus de la leucose bovine (FLK-BLV) nous ont été aimablement fournies par le Dr M.J. Van der Maaten et le Dr J.M. Miller (1976) (National Animal Disease Laboratory U.S. Departement of Agriculture, Ames, Iowa). Ces cellules sont exemptes de mycoplasmes ainsi que le montre le test "DNA-stain", (marquage des acides désoxyribonucléiques). Ces cellules sont exemptes également d'autres virus couramment rencontrés dans le bétail tel que l'indique l'étude au microscope électronique. Les cellules sont ensemencées dans des multitrays (NUNC) à raison de 250 à 300 millions de cellules dans un volume de 1,4 litre de milieu RPMI 1629, contenant 5 % de sérum foetal de veau filtré (trois fois sur 0,22 µ) et décomplémenté (56° - 30 minutes), 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml de fungizone.

Les cellules CC 81 (Fischinger et al, 1974) confiées par le Dr PERIES (Institut de recherche sur les leucémies et les maladies du sang, Laboratoire d'Hématologie Expérimentale, Hôpital Saint-Louis, Paris, France) sont des cellules de chat infectées par le virus du sarcome murin. Elles sont cultivées dans le même milieu que les cellules FLK-BLV auquel on ajoute 5 % de sérum foetal de veau supplémentaire.

Les cellules 3010 C sont des cellules de cornée provenant d'un bovin adulte atteint de lymphosarcome. Elles sont cultivées dans le même milieu que les cellules CC 81.

Le sérum foetal de veau est testé avant son utilisation. Il doit permettre une bonne croissance des cellules FLK-BLV afin d'obtenir une monocouche confluente 4-5 jours après ensemencement. Il ne doit pas contenir d'anticorps anti BLV, ce qui inhiberait l'expression du virus ; on réalise alors un test d'inhibition de la polycaryocytose précoce (test EPI). Il doit enfin permettre l'expression du virus, pour s'en assurer : quelques millilitres de milieu provenant d'une culture de cellules FLK-BLV ayant formé une monocouche confluente depuis 2 jours sont prélevés, filtrés (0,22 µ) et déposés sur une monocouche de cellules cornéennes 3010 C. La présence du virus sera observée par l'apparition de syncytia au sein de ces cellules.

2 . ANTIGENE BLV POUR LE TEST D'IMMUNODIFFUSION EN GELOSE

L'antigène, de sérodiagnostic de la leucose bovine par la méthode d'immunodiffusion en gélose, provient du milieu de culture des cellules FLK-BLV productrices du virus ; le milieu de culture est prélevé 2 - 3 jours après la formation d'une monocouche. Il est alors soumis à deux centrifugations, l'une de 3000 g pendant 10 minutes, l'autre de 10 000 g pendant le même temps.

Trente grammes de sulfate d'ammonium pour 100 ml sont ajoutés au surnageant centrifugé puis le pH est ajusté à 4,15. La solution est agitée à + 4°C pendant 12 heures puis centrifugée à 10 000 g pendant 30 minutes. Le culot est remis en suspension dans un volume d'eau distillée égal au trentième du volume original. La suspension obtenue est alors

dialysée contre du PBS à 4°C (le PBS étant régulièrement renouvelé toutes les 6 heures dans la première journée puis toutes les 12 heures pendant 3 jours). La solution est enfin centrifugée à 27 000 g pendant 10 minutes ; le surnageant est considéré comme l'antigène pur. Celui-ci est alors titré selon une méthode radioimmunologique (essai radioimmunologique de compétition), permettant d'évaluer la quantité de protéines virales contenues dans la préparation antigénique, notamment la protéine d'enveloppe du virus, gp51 et la protéine interne, p24.

3 . TEST D'IMMUNODIFFUSION (ID)

La gélose utilisée pour le test d'immunodiffusion est composée de 1 litre d'eau distillée, d'Agarose (Touzard et Matignon) (1 %), de polyéthylène glycol (30 g), d'EDTA (0,37 g), de NaCl (0,14 M), de TRIS-HCL pH 8,3 (0,01 M), et d'azoture de sodium (0,2 g). Six ml de gélose parfaitement limpide sont versés dans une boîte de Pétri de 6 cm de diamètre. Après complète solidification, 7 puits identiques sont pratiqués : un puits central séparé par 3 mm de 6 puits périphériques de 5 mm de diamètre. Les réactifs sont disposés dans les puits : 40 µl d'antigène dans le puits central, 40 µl de sérum positif (provenant d'une vache atteinte de lymphosarcome et présentant un titre de 2400 par le test EPI) dans deux puits périphériques opposés et 40 µl des sérums à tester dans les 4 puits périphériques vacants. La boîte de Pétri est laissée 48 à 72 heures en atmosphère humide à la température du laboratoire ; la lecture est alors effectuée ; 2 bandes de précipitation sont observées entre le puits central et chacun des deux puits périphériques contenant le sérum positif ; l'une correspond à la gp51, l'autre à la p24.

Un sérum à tester est positif, s'il présente un arc de précipitation s'infléchissant vers un arc du sérum de référence. Divers schémas de réactions sont présentés sur la figure n° 1.

Des dilutions successives du sérum (log_2) étant disposées dans les puits périphériques, le titre peut être évalué comme l'inverse de la dernière dilution permettant d'observer un arc de précipitation. La planche n° 1 illustre un cas observé.

4. SERUMS

Les sérums présentés dans le tableau n° 4 ont été utilisés. Ils proviennent - soit d'animaux adultes atteints de lymphosarcome enzootique (LSA), - soit d'animaux en état de lymphocytose persistante (LP), - soit d'animaux "normaux contacts" (NC) ne présentant aucun signe clinique mais ayant vécu au contact d'un animal atteint de lymphosarcome, - enfin, d'animaux normaux (N), cliniquement sains provenant d'étables sans commémoratifs de leucose.

5. TEST D'INHIBITION DE LA POLYCARYOCYTOSE PRECOCE (test EPI)

Le test est pratiqué dans des plaques Falcon Microtest II pour culture de tissus. Des dilutions sériées (log_2) des sérums à tester et du sérum positif de référence sont effectuées (0,1 ml par puits). Un même volume de milieu de culture (RPMI 1629 supplémenté en antibiotiques et en sérum foetal de veau) contenant 5×10^3 cellules FLK-BLV est ajouté par puits. La plaque est incubée à 37°C pendant une heure. Les cellules CC81 sont alors ajoutées à raison de 2×10^5 cellules dans 0,1 ml de milieu

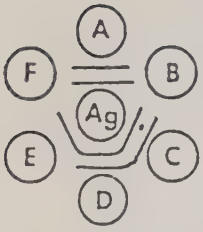

Schéma 1

A et D - Témoins positifs

B - Négatif

C - Positif : présence d'anticorps anti gp51 + anticorps anti p24

E - Positif

F - Négatif

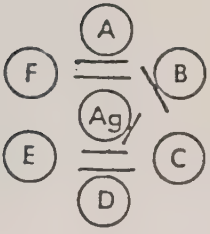

Schéma 2

A et D - Témoins positifs

B et C - Négatifs : précipités ne se raccordant pas à ceux des témoins A et D

E - Négatif

F - Négatif

Figure 1 Divers aspects de réactions d'immunoprécipitation en gélose.

Planche 1 Evaluation du titre d'un sérum par la méthode de l'Immunodiffusion ; celui-ci est estimé comme l'inverse de la dernière dilution permettant d'observer un arc de précipitation (notons que les diamètres des puits dans cet exemple ne sont pas ceux décrits dans notre étude).

TABLEAU 4

SERUMS ETUDIES PAR LES TESTS RIA - EPI - ID

n° Sérum	Origine[1]	Titre RIA p24[2]	Titre RIA gp[2]	Titre EPI[3]	Titre ID[4]
1	LSA	4×10^4	2×10^3	2394	8
2	LP	8×10^2	NF	1596	8
3	LP	5×10^3	NF	598	32
4	LSA	6×10^3	NF	532	NF
5	LSA	6×10^3	NF	2394	32
6	LSA	8×10^2	3×10^3	798	16
7	LSA	2×10^4	3×10^2	NF	NF
8	LSA	7×10^3	3×10^3	798	32
9	LSA	1×10^4	1×10^4	1596	32
10	LSA	2×10^4	2×10^2	1197	32
11	LSA	$1,5 \times 10^4$	3×10^2	2394	32
12	LSA	1×10^5	1×10^3	25536	32
13	LSA	6×10^2	3×10^2	399	32
14	LSA	8×10^4	2×10^3	96768	32
15	LSA	$2,4 \times 10^5$	1×10^4	24192	32
16	LSA	2×10^5	3×10^4	96768	32

TABLEAU 4 (suite)

n° Sérum	Origine[1]	Titre RIA p24[2]	Titre RIA gp[2]	Titre EPI[3]	Titre ID[4]
17	LSA	7×10^3	$4{,}2 \times 10^2$	3192	32
18	LSA	$2{,}5 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^3$	6384	32
19	LP	$1{,}2 \times 10^4$	4×10^2	34	1
20	LP	8×10^2	0	47	0
21	LP	4×10^3	2×10^3	107	2
22	LP	8×10^3	4×10^2	192	2
23	LP	$2{,}8 \times 10^4$	2×10^2	256	2
24	LP	6×10^3	3×10^2	376	4
25	LP	8×10^2	9×10^1	94	2
26	LP	$1{,}6 \times 10^3$	3×10^2	113	2
27	LP	8×10^3	3×10^2	154	2
28	LP	2×10^3	NF	52	2
29	LP	30	NF	47	4
30	LP	5×10^2	NF	33	1
31	LP	8×10^3	NF	376	4
32	LP	NF	NF	252	8
33	N	NF	NF	75	1
34	N	$2{,}4 \times 10^2$	9×10^1	50	1

TABLEAU 4 (suite)

n° Sérum	Origine[1]	Titre RIA p24[2]	Titre RIA gp[2]	Titre EPI[3]	Titre ID[4]
35	N	NF	NF	199	1
36	N	2×10^2	4×10^1	199	2
37	N	$2{,}8 \times 10^2$	7×10^1	399	2
38	N	$1{,}2 \times 10^3$	3×10^2	798	8
39	LP	$1{,}6 \times 10^3$	3×10^2	113	2
40	LP	2×10^3	3×10^2	376	4
41	N	$2{,}8 \times 10^2$	$1{,}2 \times 10^2$	798	1
42	N	$1{,}5 \times 10^3$	5×10^2	798	16
43	N	$1{,}2 \times 10^2$	2×10^2	598	2
44	N	$2{,}2 \times 10^2$	8×10^1	399	4
45	LSA	$7{,}5 \times 10^4$	2×10^3	12096	64
46	LSA	$2{,}5 \times 10^4$	1×10^4	NF	64
47	N	2×10^2	3×10^1	NF	1
48	N	$7{,}5 \times 10^2$	9×10^2	798	16
49	NC	5×10^2	5×10^2	1512	8
50	NC	5×10^2	2×10^3	18144	64
51	NC	$2{,}2 \times 10^3$	2×10^2	12096	1
52	NC	$7{,}5 \times 10^1$	5×10^2	12096	4

TABLEAU 4 (suite)

n° Sérum	Origine[1]	Titre RIA p24[2]	Titre RIA gp[2]	Titre EPI[3]	Titre ID[4]
53	NC	NF	$1,7 \times 10^2$	3024	4
54	NC	$1,2 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$	12096	4
55	NC	$1,7 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	567	4
56	LSA	$1,6 \times 10^4$	5×10^2	4536	32

1.- Origine : abréviations : LSA = lymphosarcome d'adulte
LP = lymphocytose persistante
NC = (animaux) "normaux contact"
N = (animaux) "normaux"
NF = non fait

2.- Titre RIA p24 : évalués comme l'inverse de la dilution du sérum qui lie 50 % de l'antigène radioactif.

Titre RIA gp : idem

3.- Titre EPI : évalué comme l'inverse de la dilution du sérum qui provoque une diminution de 50 % du nombre de syncytia.

4.- Titre ID : évalué comme l'inverse de la dernière dilution permettant d'observer un arc de précipitation.

de culture. La plaque scellée avec une feuille de plastique adhésive est placée dans une étuve (37°) pendant 24 heures. Les monocouches sont alors rincées 3 fois (PBS), fixées 10 minutes dans de l'alcool méthylique à 70 % et colorées avec la solution de Giemsa au 1/10° pendant le même temps. On apprécie alors par la méthode simplifiée (estimation oculaire globale) les titres de sérums ; ceux-ci sont ensuite corrigés ($SID_{50}N$) pour tenir compte des fluctuations du nombre de syncytia par référence aux cultures non traitées.

6 . ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE - (RIA p 24 et RIA gp)

Les sérums à tester (200 µl) sont dilués de façon sériée (de 1 x 10^2 à 3 x 10^6) dans un tampon TRIS pH 7,9 (0,01 M) contenant : NaCl (0,05M), EDTA (0,001 M), TRITON X-100 (0,1 %), sérum albumine bovine (BSA) 1 % et 2 ml de sérum normal bovin (sauf pour la première dilution). La protéine purifiée (p24 ou gp51) marquée à l'iode 125 (2 x 10^4 cpm) (voir chapitre "DESCRIPTION DES TECHNIQUES", l'essai radioimmunologique) est ajoutée à chacune de ces dilutions ; après incubation à 37°C pendant 3 heures et 4°C pendant 2 heures suivantes, 150 µl d'un antisérum de chèvre dirigé contre les immunoglobulines bovines sont ajoutées, l'ensemble est alors soumis à une nouvelle incubation d'une heure à 37°C et de deux heures à 4°C. Les tubes sont alors lavés avec 500 µl d'un tampon TRIS pH 7,9 (0,01 M) contenant NaCl (0,01 M), Triton X-100 (0,1 %). Après centrifugation (3700 g pendant 15 minutes), la radioactivité du culot est déterminée. Les titres des sérums sont exprimés comme l'inverse de la dilution qui lie 50 % de l'antigène (p24 ou gp51) radioactif.

7 . ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE DE COMPETITION

Cette technique permet d'identifier et de quantifier les protéines virales (p24 et gp51) contenues dans les préparations antigéniques.

La protéine p24 est iodinée (^{125}I) selon la méthode utilisant la chloramine T (Greenwood et al, 1963), la glycoprotéine gp51 selon la méthode utilisant l'iodogène (Devare et Stephenson, 1977).

Des dilutions successives d'un antigène à tester sont réalisées dans 200 µl d'un tampon Tris HCl pH 7,9 (0,01 M), NaCl (0,05 M), EDTA (1 mM), Triton X-100 (0,1 %), sérum albumine bovine (1 %). Un antisérum de lapin dirigé contre le BLV étant ajouté, les tubes sont placés à 37°C pendant 1 heure.

La protéine marquée à l'iode 125, ^{125}I-p24 ou ^{125}I-gp51 (20 000 cpm) est ajoutée. L'ensemble est soumis à une nouvelle incubation de 3 h à 37°C et de 12 h à +4°C. Afin d'entraîner la précipitation des immuns complexes, une solution de staphylocoque doré à 10 % (Kessler, 1975) est déposée ; les tubes sont ensuite placés à + 4°C pendant 30 minutes. Un lavage est effectué avec 500 µl d'un tampon Tris HCl pH 7,9 (0,01 M), NaCl (0,1 M), EDTA (1 mM) et Triton X-100 (0,1 %) ; après centrifugation (3600 g pendant 15 minutes), le culot est repris dans 500 µl du même tampon et recentrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant étant éliminé, la radioactivité du culot est déterminée. On réalise alors une courbe correspondant aux pourcentages de précipitation de la protéine radioactive pour chaque dilution de l'antigène à tester. La quantité de protéines (gp51 ou p24) est évaluée par comparaison avec une courbe étalon correspondant aux dilutions sériées d'une quantité connue de protéine purifiée (gp51 ou p24).

8 . ANALYSE STATISTIQUE

Les corrélations établies entre les tests de séro-diagnostic (RIA - EPI - ID) ont été réalisées à l'aide d'une calculatrice (TEXAS INSTRUMENTS), le programme utilisé (PGM 1) permet d'établir les droites de régression (regression linéaire en coordonnées logarythmiques) et donne les valeurs des coefficients de corrélation.

Leur degré de signification (p) est estimé selon Fisher et Yates (1963).

B. RESULTATS

1. RESULTATS OBTENUS AVEC UN ANTIGENE COMMERCIAL

La spécificité et la sensibilité de la méthode d'immunodiffusion, utilisant deux lots d'un antigène commercial de"diagnostic de la leucose bovine", ont été comparées à celles d'autres techniques, tels l'essai radio-immunologique et le test EPI.

Dix sept sérums provenant de bovins atteints de lymphosarcome contagieux (LSA) et 2 sérums provenant de bovins atteints de leucose sporadique (LSJ) (anticorps anti-BLV inexistants) ont été utilisés.

Le tableau récapitulatif suivant montre que les antigènes du commerce n'ont pu être utilisés dans les études suivantes car ils ne décèlent que 41 % des sérums positifs étudiés, et décèlent en outre 12 % de faux positifs (leucose sporadique).

TABLEAU 5

COMPARAISON ID (antigène commercial) - EPI - RIA

	Nombre de sérums	Détectés par		
		ID	EPI[x]	RIA[xx]
se LSA	17	7	17	17
se LSJ	2	2	0	0

[x] EPI : titre EPI ⩾ 400

[xx] RIA : Titre RIA p24 ⩾ 6 10^2

Dans ces conditions, nous avons été amenés à préparer un antigène de diagnostic pour réaction d'immunodiffusion en gélose.

2 . MISE AU POINT D'UN TEST D'IMMUNODIFFUSION

Quatre formules de gélose ont été étudiées avec un même sérum et un même antigène. Les trois premières formules contiennent les mêmes composants : Agarose et NaCl, mais se distinguent dans la concentration de ceux-ci. La quatrième, dont la formule est détaillée dans le chapitre "MATERIEL ET METHODES", utilise en plus des constituants précédents, de l'azoture de sodium, du polyéthylène glycol et de l'éthylène diamine tétracétique. Cette dernière formule présente l'avantage d'offrir une gélose compacte et bien hydratée ce qui affine la réaction de précipitation et en améliore la lecture. Les résultats obtenus avec cette quatrième variété de gélose ont été très nettement supérieurs à ceux obtenus avec les autres variétés. Cette gélose a donc été retenue pour les expérimentations ultérieures.

2-1.- Titrage de l'antigène et recherche de sa concentration optimale

a) Titrage biochimique

Un antigène a été préparé, son contenu en glycoprotéine (gp51) et en protéine interne (p24) a été estimé par l'essai radioimmunologique de compétition. Parallèlement, les lots d'antigènes du commerce utilisés dans l'étude comparative précédente ont été testés.

Les résultats présentés dans le tableau 6 montrent que :

- l'antigène préparé possède les deux protéines virales majeures,

p24 ou gp51 (on remarquera 5 fois plus de p24 que de gp51).

- les lots d'antigène du commerce présentent des concentrations très inégales de ces 2 protéines.

Remarquons que la faible concentration en p24 et en gp51 de l'antigène du commerce n° 1 pourrait expliquer le faible pourcentage de sérums très positifs détectés (voir tableau 5).

TABLEAU 6

ANTIGENES (µg/ml) CONTENUS DANS DIVERSES PREPARATIONS

Antigènes	du laboratoire	du commerce n°1	du commerce n°2
p24	21	0,12	5,8
gp51	4	1,22	6,8

b) Titrage par la technique d'immunodiffusion en gélose (ID)

- Sérum de référence

Un sérum de référence provenant d'un bovin adulte atteint de lymphosarcome enzootique a été titré par l'essai radioimmunologique, par le test EPI et la méthode d'immunodiffusion après dilutions sériées. Le titre RIA en anticorps anti gp est de 2×10^4, et le titre RIA en anticorps anti p24 : $2,5 \times 10^4$. La valeur $SID_{50}N$ en test EPI est de 2400. Ce sérum dilué de façon sériée (log_2) est placé dans les puits périphéri-

ques de la plaque de gélose. L'antigène pur est déposé dans le puits central. Après précipitation, on peut observer deux arcs jusqu'à la dilution 1/4, puis un seul jusqu'à la dilution 1/32. Ce deuxième arc correspond à la réaction gp51 - anti gp51 (figure 2).

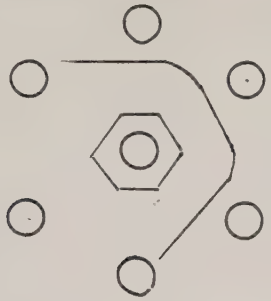

Figure 2

Conformément aux résultats donnés par le test radioimmunologique, l'antigène détecte les deux types d'anticorps (anti p24 et anti gp).

- Recherche de la concentration optimale en antigène

Six plaques de gélose ont été utilisées pour la réalisation d'un échiquier : chacune contient dans les puits périphériques des dilutions croissantes (log_2) du sérum de référence et dans le puits central l'antigène, pur ou dilué (1/1 - 1/32).

Les résultats rassemblés dans le tableau 7 montrent que :

1) les anticorps sont décelés à toutes les dilutions du sérum de référence par l'antigène pur, ou dilué jusqu'au quart.

2) l'antigène dilué au trente deuxième détecte encore les anticorps du sérum de référence non dilué.

TABLEAU 7

RESULTATS OBTENUS PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION EN GELOSE, DILUTION DE L'ANTIGENE ET DU SERUM

Dilutions	Antigène	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Anticorps							
1/1		+	+	+	+	+	+
1/2		+	+	+	+	+	-
1/4		+	+	+	+	+	-
1/8		+	+	+	-	-	-
1/16		+	+	+	-	-	-
1/32		+	+	+	-	-	-
Plaques n°		1	2	3	4	5	6

L'antigène dilué au quart offrant une lecture moins aisée que lorsqu'il est utilisé pur ou dilué 2 fois, il nous est apparu préférable de l'utiliser soit pur, soit dilué deux fois. Toutefois, dans les expérimentations qui suivent, l'antigène est employé pur.

La méthode d'immunodiffusion en gélose étant standardisée quant à ses réactifs : - antigène titré par RIA et testé en ID, - sérum positif titré par RIA, EPI et testé en ID, - gélose ; il a été possible d'évaluer sa sensibilité par comparaison avec d'autres techniques réputées sensibles

tels l'essai radioimmunologique et le test EPI.

3. SENSIBILITE DU TEST D'IMMUNODIFFUSION

Les sérums utilisés proviennent d'animaux atteints de lymphosarcome de l'adulte (LSA), d'animaux présentant une lymphocytose persistante (LP), d'animaux hématologiquement et cliniquement sains, ayant été en contact avec des animaux infectés par le BLV (normaux contact ou NC) et enfin d'animaux normaux n'ayant jamais été en contact avec les précédents (N). Les sérums sont évalués quant à leur contenu en anticorps selon quatre techniques différentes : RIA gp51, RIA p24, EPI et ID. Les valeurs obtenues pour l'ensemble des sérums par une technique ont été corrélées successivement avec celles obtenues par les autres techniques. Ceci permet d'une part, d'apprécier la spécificité relative de chacune d'entre elles, et d'autre part de déterminer leur sensibilité.

3-1.- Sensibilités relatives des tests RIA et EPI

Corrélation entre les titres estimés par les tests RIA p24 et EPI

L'effectif est de 51 sérums. La droite de régression obtenue est de la forme :

$$\log (\text{titre RIA p24}) = a \log (\text{titre EPI}) + b$$

avec $a = 0{,}5505$

$b = 68{,}1980$

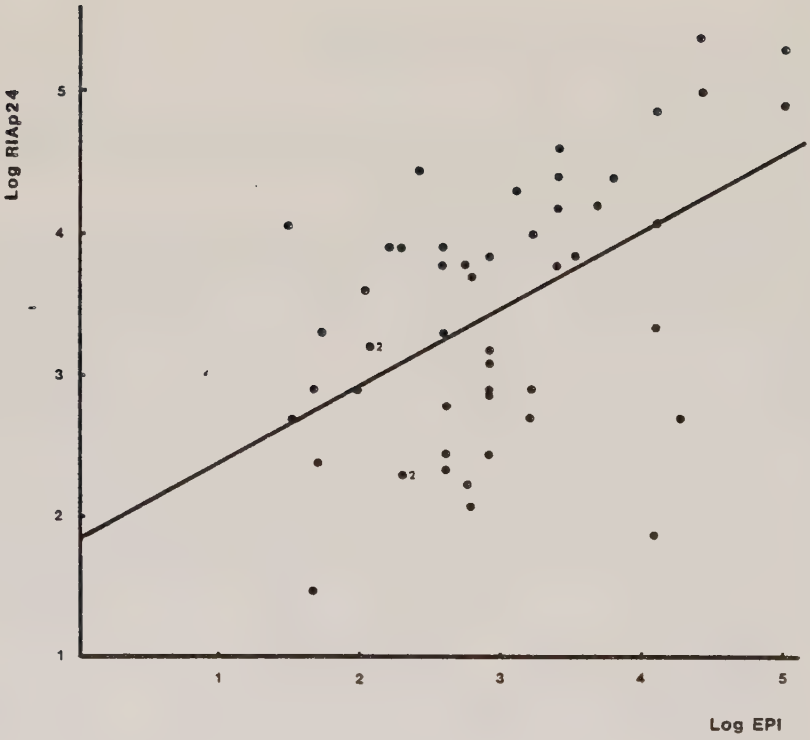

Figure 3 Corrélation entre les titres des sérums bovins estimés par le RIAp24 et l'EPI.

Le coefficient de corrélation r = 0,5231 avec p < 0,001 et ddl = 49, indique que la régression est hautement significative (figure 3).

Dans ces conditions, on peut considérer qu'en moyenne le test EPI permettra de déceler des anticorps lorsque leur titre RIA p24 sera au moins égal à 68.

Corrélation entre les titres estimés par les tests RIA gp et EPI

L'effectif est de 43 sérums. La droite de régression est de la forme :

log (titre RIA gp) = a log (titre EPI) + b

avec a = 0,4409
b = 23,5789

Le coefficient de corrélation r = 0,5736 avec p < 0,001 et ddl = 41, indique que la régression est hautement significative (figure 4).

On peut considérer que les deux tests : RIA gp et EPI, sont également sensibles, la valeur du b (23,5789) se confondant avec le "bruit de fond" du test RIA. Ainsi, bien qu'il soit possible que le RIA et le test EPI ne révèlent pas (qualitativement ou quantitativement) les mêmes anticorps, les résultats obtenus prouvent que les deux techniques permettent de détecter l'une et l'autre l'infection par le BLV avec une sensibilité approximativement identique.

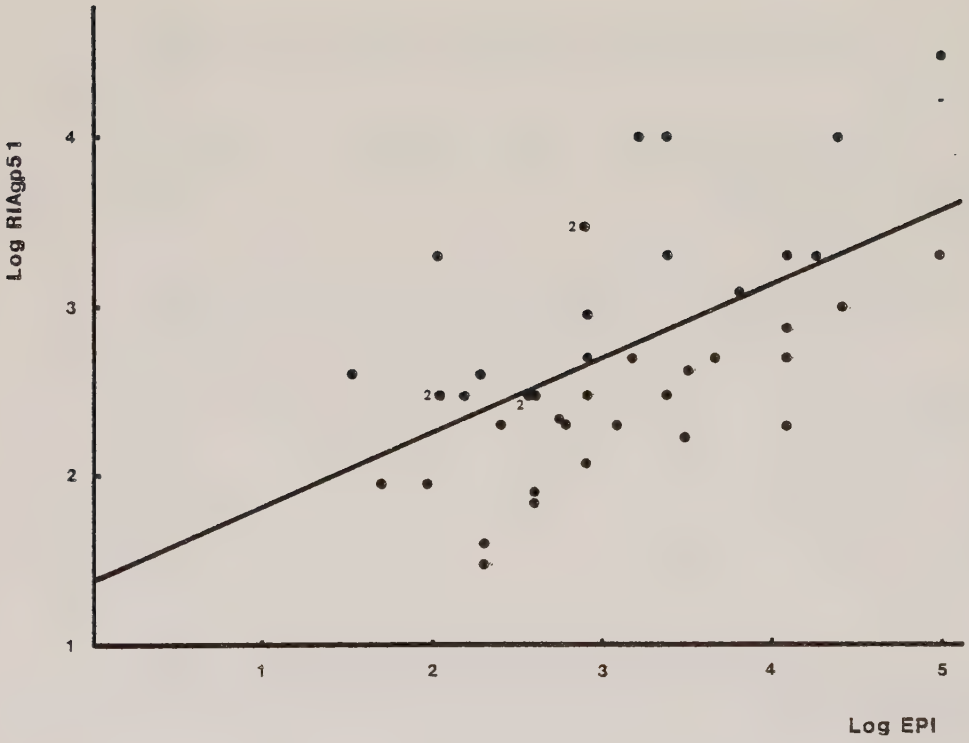

Figure 4 Corrélation entre les titres des sérums bovins estimés par le RIAgp51 et l'EPI.

3-2.- Sensibilités relatives des tests ID, RIA et EPI

Corrélation entre les titres estimés par les tests RIA et ID

49 sérums ont été étudiés en RIA p24 et en ID, 43 sérums d'autre part ont été testés en RIA gp et en ID.

Les droites de régression obtenues sont de la forme :

(1) log (titre RIA p24) = a log (titre ID) + b

avec a = 0,8085
b = 582,9979 (figure 5)

(2) log (titre RIA gp) = a log (titre ID) + b

avec a = 0,7676
b = 115,8800 (figure 6)

Les coefficients de corrélation : r (1) = 0,5156 avec $p < 0,001$ et ddl = 47, et r (2) = 0,6820 avec $p < 0,001$ et ddl = 41 indiquent que les régressions sont hautement significatives.

Il apparaît clairement que le test ID est moins sensible que le RIA. On peut considérer qu'un sérum ne pourra être détecté en ID que si son titre est $\geqslant 115$ par le RIA gp et/ou $\geqslant 583$ par le RIA p24. Soulignons que ces seuils de sensibilité n'ont qu'une valeur statistique et qu'ils ne peuvent être appliqués au cas par cas.

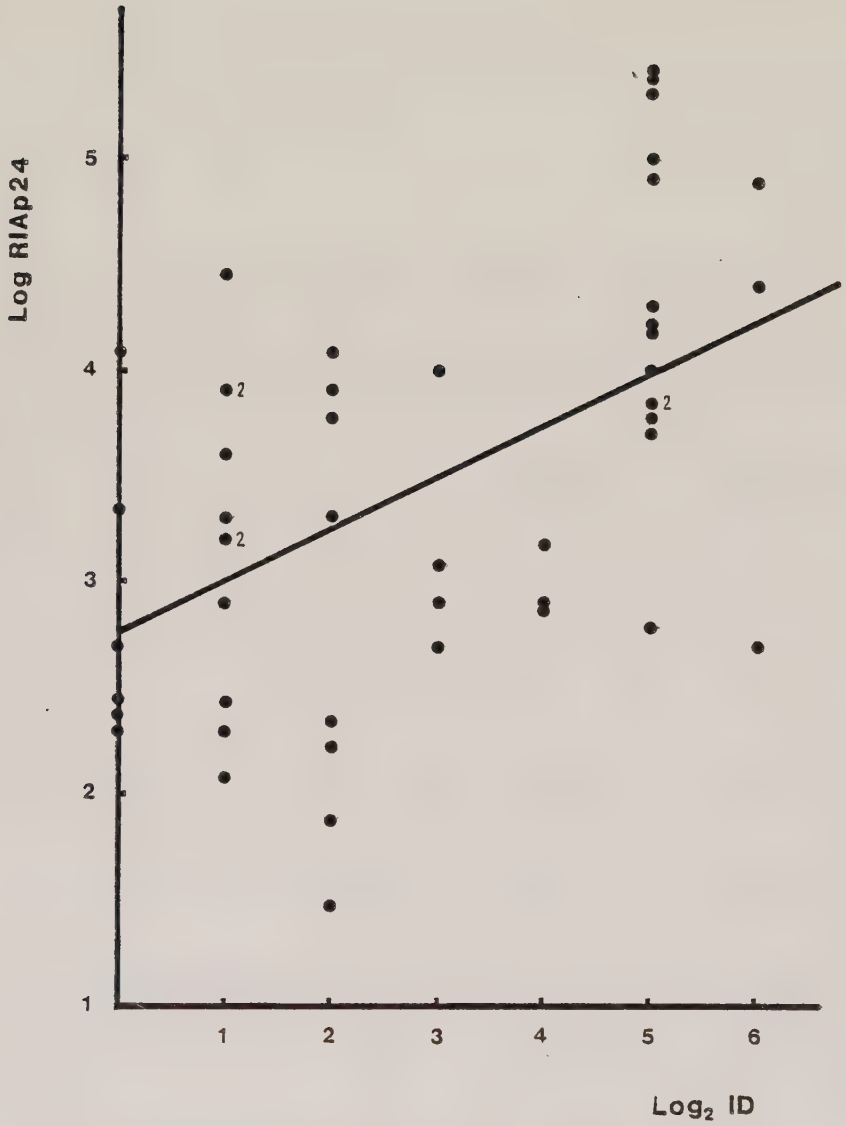

Figure 5 Corrélation entre les titres des sérums bovins estimés par le RIA p24 et l'ID.

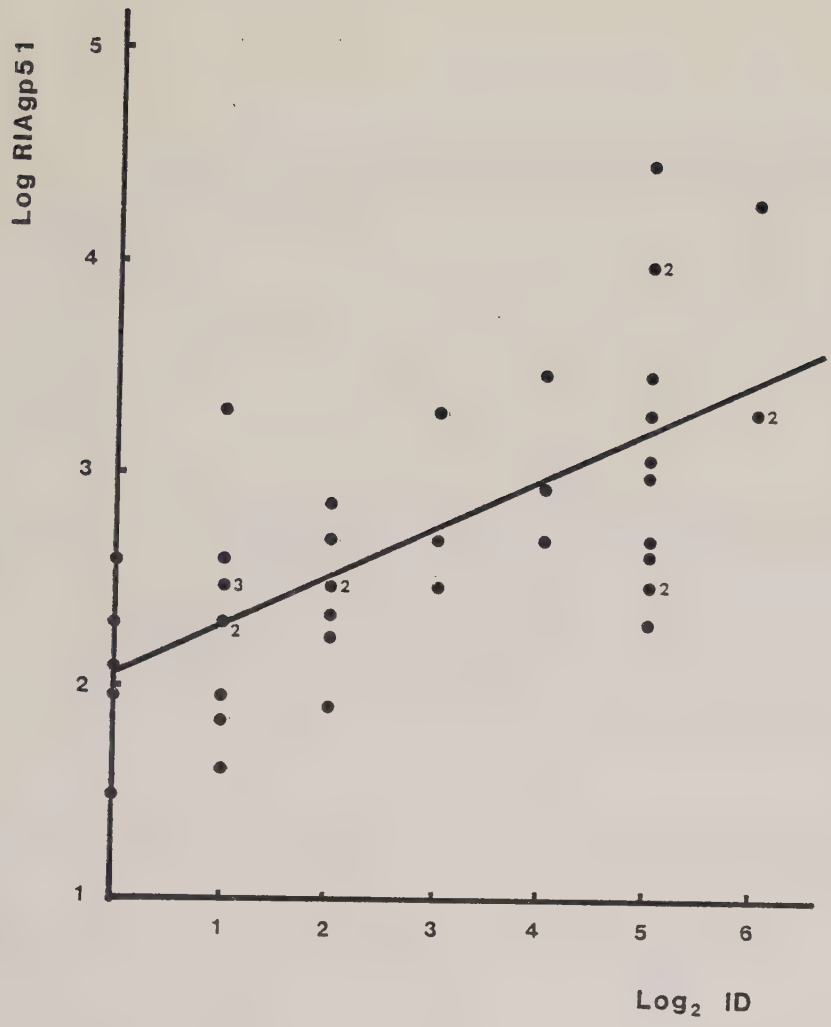

Figure 6 Corrélation entre les titres des sérums bovins estimés par le RIA gp51 et l'ID.

Corrélation entre les titres estimés par les tests EPI et ID

L'effectif est de 53 sérums. La droite de régression obtenue est de la forme :

$$\log (\text{titre EPI}) = a \log (\text{titre ID}) + b$$

avec $a = 0,9672$

$b = 139,0940$

Le coefficient de corrélation $r = 0,6680$ avec $p < 0,001$ et $ddl = 51$, indique que la régression est hautement significative (figure 7).

Ces résultats montrent que le test EPI est plus sensible que l'ID, que ces deux techniques révèlent toutes deux, l'infection par le BLV et qu'en moyenne un sérum ne peut être détecté en ID que si son titre est $\geqslant 139$ par le test EPI.

3-3.- Conditions nécessaires pour optimiser la sensibilité du test d'immunodiffusion

Une dernière corrélation concernant les titres de sérums observés par le test RIA p24 et par le test RIA gp a été étudiée. La figure 8 illustre la droite de régression obtenue par l'analyse statistique des 43 sérums étudiés. L'équation de la droite peut être formulée par :

$$\log (\text{titre RIA p24}) = a \log (\text{titre RIA gp}) + b$$

avec $a = 0,9065$

$b = 11,5644$

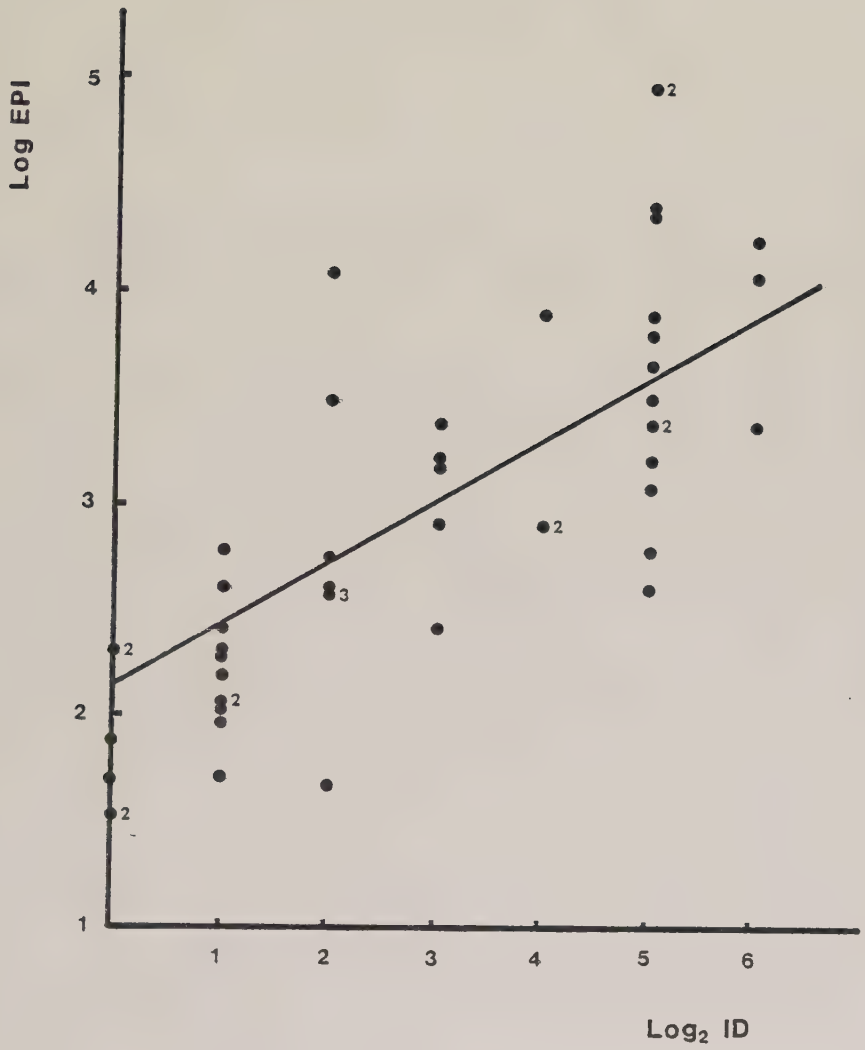

Figure 7 Corrélation entre les titres des sérums bovins estimés par l'EPI et l'ID.

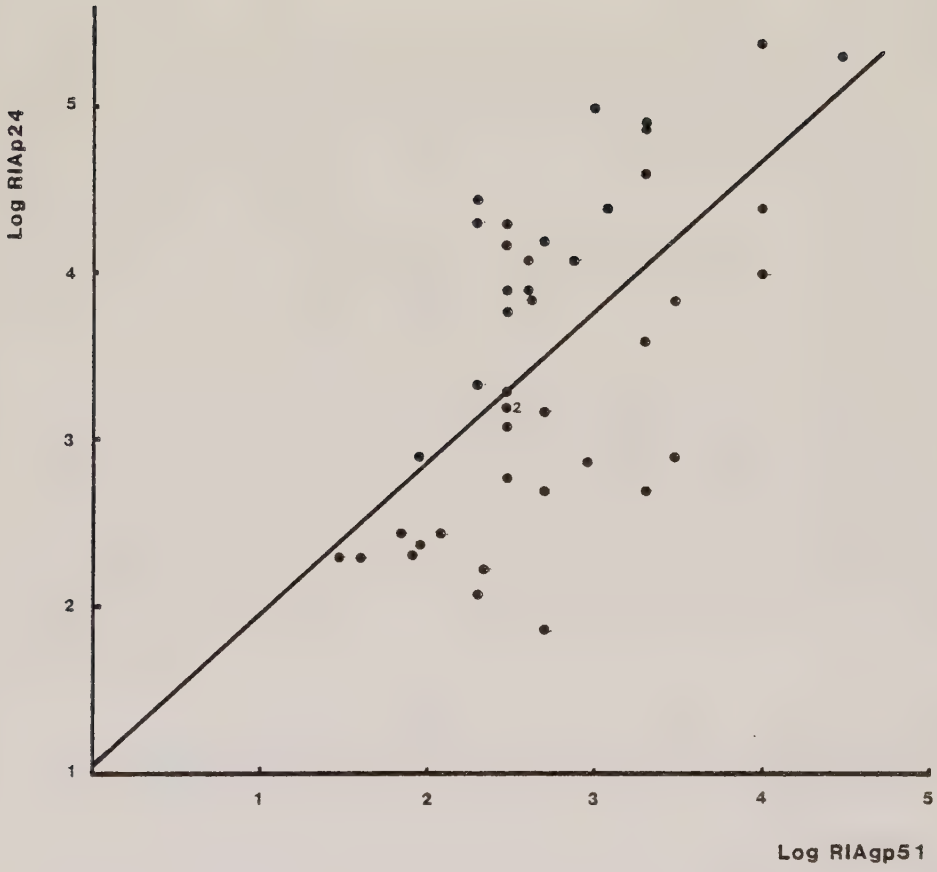

Figure 8 Corrélation entre les titres des sérums bovins estimés par le RIA p24 et le RIA gp51.

Le coefficient de corrélation $r = 0,6319$ avec $p < 0,001$ et ddl = 41, indique que la régression est hautement significative.

Si l'on tient compte des seuils de sensibilité relatifs des tests ID, RIA p24 et RIA gp51, les sérums positifs en RIA peuvent être classés en 4 catégories (figure 9). Le cadran (A) représente la catégorie de sérums contenant suffisamment d'anticorps anti p24 pour être décelés par ID ; on n'observe qu'une seule bande de précipitation correspondant au complexe p24-anticorps anti p24 ; le taux en anticorps dirigés contre la glycoprotéine de tels sérums est insuffisant pour être décelés par ID. Le cadran (B) correspond à la majorité des sérums détectés par ID ; ceux-ci contiennent suffisamment d'anticorps anti p24 et anti gp pour présenter deux bandes de précipitation. Le cadran (C) représente les sérums possédant suffisamment d'anticorps anti gp pour être décelés par ID ; leur faible contenu en anticorps anti p24 ne permet pas de les visualiser ; on n'observe donc qu'une seule bande de précipitation. Enfin, le cadran (D) correspond aux sérums positifs dans les tests RIA mais négatifs en ID en raison de leur faible taux d'anticorps.

Bien que ces résultats n'aient qu'une valeur statistique, et ne puissent être appliqués au "cas par cas", ils indiquent nettement, compte-tenu de notre échantillonnage, que :

- 72 % des sérums positifs seront détectés par ID, quel que soit l'antigène utilisé, ID p24 (antigène p24) ou ID gp51 (antigène gp51).

- 16 % des sérums positifs seront détectés seulement par ID p24 ou seulement par ID gp51.

- enfin 12 % des sérums décelés positifs par les tests RIA ne seront pas détectés par le test ID.

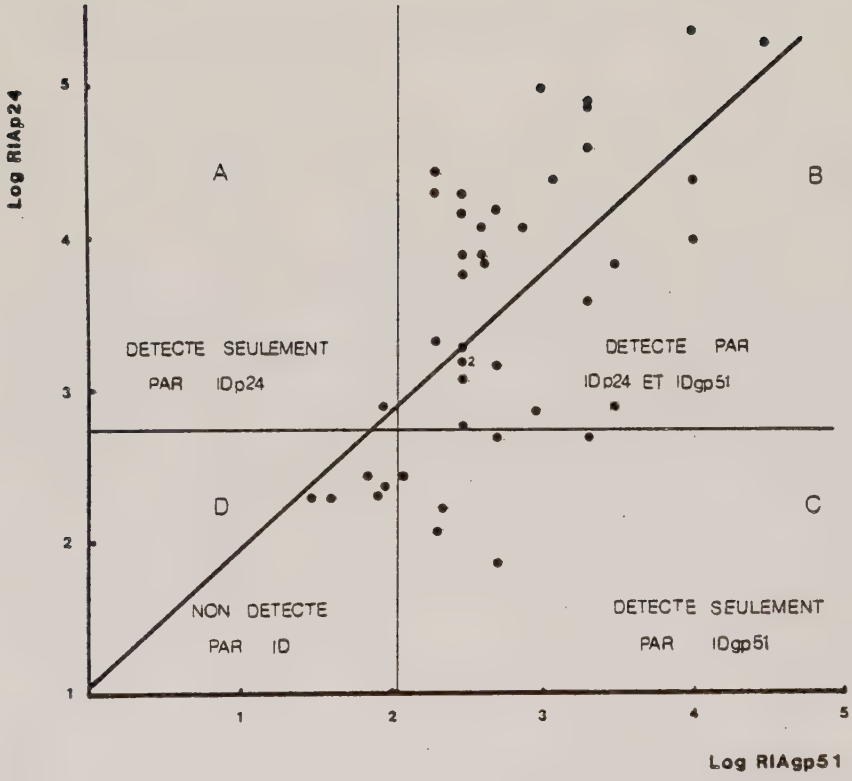

Figure 9 Catégories de sérums (positifs par les tests RIA) décelés ou non par l'ID. Le report des seuils de sensibilité de l'ID sur les axes de coordonnées permet de classer les sérums en 4 catégories.

Il apparaît donc nécessaire afin d'augmenter la sensibilité du test ID, d'utiliser un antigène contenant les deux protéines virales (p24 et gp51) ; en effet, bien que la majorité des sérums soient détectables en ID par l'utilisation d'un antigène ne contenant que la gp51, environ 2 % ne pourront être détectés que par l'utilisation d'un antigène contenant la protéine interne p24. L'analyse statistique montre enfin que certains animaux présentant un titre en anticorps faible, ne pourront être détectés par l'ID. De telles données ayant été acquises par une analyse mathématique sur un nombre limité de sérums, il était donc important de les éprouver par une enquête effectuée sur une plus grande échelle. Cette étude a été réalisée dans un canton de la Gironde, très contaminé, ainsi qu'il ressort d'une enquête utilisant le test EPI.

4. RESULTATS COMPARATIFS OBTENUS DANS UNE ENQUETE SEROEPIDEMIOLOGIQUE PAR LES TESTS EPI ET ID

Une enquête séroépidémiologique de grande envergure portant sur la totalité du cheptel d'un canton a été effectuée à l'aide du test EPI. Compte-tenu du seuil de sensibilité de la méthode d'immunodiffusion, nous avons déterminé le pourcentage théorique d'animaux infectés, décelables par cette méthode. Ce pourcentage théorique a ensuite été comparé à celui des animaux effectivement positifs par l'ID dans une enquête réalisée dans le même canton.

4-1.- Infection par le BLV détectée par le test EPI

Sur les 379 troupeaux étudiés par le test EPI, seuls ont été retenus ceux comprenant au moins quatre "têtes", soit 4210 animaux testés. Un animal est considéré positif lorsque son titre en anticorps dirigés

contre le BLV ($SID_{50}N$) est supérieur ou égal à 25. Les résultats de cette enquête sont présentés dans les tableaux 8 et 9. Ils montrent un taux d'infection élevé, en effet, 90,6 % des troupeaux sont positifs, soit un effectif de 68,2 % des animaux. En outre, plus de la moitié des troupeaux (55 %) est fortement infectée (au moins un animal dont le titre EPI est supérieur à 139), dans ces troupeaux on observe 15,3 % d'animaux avec un titre au moins aussi élevé.

4-2.- Résultats escomptés dans une enquête à l'aide de la méthode ID

Si l'on tient compte du seuil de sensibilité de la méthode d'immunodiffusion en gélose, on peut calculer parmi les troupeaux positifs par le test EPI, le pourcentage de ceux escomptés positifs par la méthode ID. Le même type de calcul peut être réalisé sur les animaux. Les résultats présentés dans les tableaux 8 et 9 montrent que 60,6 % des troupeaux positifs en EPI et 22,4 % des animaux également positifs en EPI devraient être décelés en appliquant la méthode ID.

TABLEAUX 8 et 9

RESULTATS D'UNE ENQUETE SEROEPIDEMIOLOGIQUE UTILISANT LE TEST EPI

RESULTATS ESCOMPTES PAR L'UTILISATION DU TEST ID

Tableau 8 : au niveau des troupeaux

Nombre total de troupeaux[1]	Troupeaux positifs par le test EPI[2]		Troupeaux positifs par le test EPI avec $SID_{50}^N \geqslant 139$[3]		Pourcentage escompté de troupeaux positifs par le test EPI, décelables par l'ID
	Nombre	%	Nombre	%	
308	279	90,6	169	54,9	60,6

1. Troupeaux contenant au moins 4 animaux.
2. Troupeaux avec un ou plusieurs animaux positifs par le test EPI.
3. Troupeaux avec un ou plusieurs animaux dont le titre en EPI est supérieur ou égal à 139 (seuil moyen de sensibilité pour le test d'immunodiffusion).

Tableau 9 : au niveau des animaux

Nombre total d'animaux[1]	Animaux positifs par le test EPI		Animaux positifs par le test EPI avec $SID_{50}^N \geqslant 139$[2]		Pourcentage escompté d'animaux positifs par le test EPI décelables par l'ID
	Nombre	%	Nombre	%	
4210	2872	68,2	645	15,3	22,4

1. Tous ces animaux proviennent de troupeaux contenant au moins 4 bovins.
2. Seuil moyen de sensibilité pour le test d'immunodiffusion.

4-3.- Résultats effectivement obtenus dans une enquête à l'aide de la méthode ID

Le test ID a été appliqué au même cheptel, mais sur un nombre d'animaux plus restreint, permettant cependant une analyse statistique satisfaisante.

La technique utilisée est celle décrite dans le chapitre "MATERIEL ET METHODE", mais le sérum positif de référence est disposé dans 3 puits périphériques alternés. L'antigène contient 4 µg/ml de gp51 et 21 µg/ml de p24.

Sur les 26 troupeaux qui ont été étudiés, 13 sont faiblement infectés (animaux dont les titres EPI sont inférieurs à 139) et 13 sont fortement infectés (au moins 1 animal dont le titre EPI est supérieur ou égal à 139).

Sur 276 animaux qui ont été testés, 238 (soit 86,2 %) sont positifs en EPI.

Les résultats obtenus en ID et présentés dans les tableaux 10 et 11 sont les suivants : 11 troupeaux sont positifs (soit 42,3 %) et 36 animaux réagissent en ID (soit 15,1 %).

TABLEAUX 10 et 11

RESULTATS D'UNE ENQUETE UTILISANT LES TESTS EPI ET ID

Tableau 10 : au niveau des troupeaux

Nombre de troupeaux étudiés	Troupeaux avec $SID_{50}^{N} \geq 139^{X}$		Troupeaux positifs en EPI escomptés décelables en ID		Troupeaux décelés positifs en ID	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
26	13	50	15,75	60	11	42,3

[X] Troupeaux contenant au moins un animal dont le titre EPI est ≥ 139.

Tableau 11 : au niveau des animaux

Nombre d'animaux étudiés	Animaux positifs en EPI		Animaux positifs en EPI escomptés positifs en ID		Animaux décelés positifs en ID	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
276	238	86,2	53	22,4	36	17,5

L'application du test de conformité (X^2) aux résultats obtenus montre un parfait accord avec l'hypothèse. On peut donc considérer que le seuil de 139 en EPI est celui auquel l'immunodiffusion détecte statistiquement les animaux infectés par le BLV.

Cette enquête séroépidémiologique quoique limitée utilisant la méthode d'immunodiffusion montre que cette technique s'applique parfaitement au dépistage d'animaux fortement infectés par le BLV, ainsi qu'au dépistage de troupeaux comprenant de tels animaux. Cette enquête a permis de vérifier l'exactitude des données statistiques établissant l'étroite corrélation liant les tests ID, EPI et RIA, la différence essentielle étant le seuil de sensibilité. On peut estimer qu'un sérum sera détecté par la méthode ID lorsque son titre sera au moins égal à 139 par le test EPI, 115 par le RIAgp ou 582 par le RIA p24. De tels seuils de sensibilité permettraient la détection d'environ 60 % des troupeaux infectés et approximativement 22 % des animaux positifs.

IIIème partie

CONCLUSION - DISCUSSION

On dispose de nombreuses méthodes sérologiques de diagnostic de l'infection par le virus de la leucose enzootique bovine (BLV) ; les anticorps décelés par ces méthodes sont dirigés soit contre la protéine interne du virus (p24) soit contre la glycoprotéine d'enveloppe (gp51), soit contre les deux. Certaines méthodes présentent des difficultés d'utilisation et ne sont plus actuellement utilisées pour la pratique courante, ce sont : l'Immunofluorescence (IF), en raison de difficultés de lecture et d'interprétation de résultats faiblement positifs et la fixation du complément, en raison de difficultés dues à l'activité anticomplémentaire de nombreux sérums bovins. Par contre, d'autres méthodes sont largement éprouvées : notamment l'Immunodiffusion en gélose (ID), l'essai radio-immunologique (RIA p24 ou RIA gp51) et le test d'inhibition de la polycaryocytose précoce (EPI) qui permettent d'envisager la réalisation d'enquêtes séroépidémiologiques de large envergure.

L'immunodiffusion en gélose présente l'avantage d'être plus simple à réaliser que les tests RIA et EPI ; c'est une des raisons pour lesquelles un groupe d'experts a retenu son utilisation dans les pays du Marché Commun. Il est apparu dès lors souhaitable d'évaluer la spécificité et la sensibilité de cette méthode. Les antigènes commerciaux pour ID n'ayant pas donné des résultats satisfaisants, nous avons donc mis au point notre propre antigène de diagnostic.

Cet antigène provient du milieu de culture de cellules productrices de BLV ; lorsqu'il est confronté, dans la technique d'Ouchterlouny, à des sérums de bovins infectés par le BLV, un ou deux arcs de précipitation

apparaissent. Ces arcs correspondent aux complexes : p24-anticorps anti p24, gp51-anticorps anti gp51.

La mise en présence de dilutions sériées d'antigène et d'immunsérum montre que ce réactif convient pour ce type de réaction immunologique et permet la détection d'anticorps relativement dilués.

La spécificité de la réaction est démontrée par l'absence de précipitation avec des sérums provenant d'animaux atteints de lymphosarcome dans la forme sporadique de la maladie (absence d'anticorps dirigés contre le BLV) et d'animaux indemnes, non infectés par le virus.

Une analyse biochimique a permis d'évaluer le contenu en protéines virales des préparations antigéniques ; une valeur de 3 à 4 µg de glycoprotéine par ml d'antigène est retenue car elle offre une sensibilité maximum ; la protéine interne p24 est dans ces conditions présente en quantité suffisante (concentration minimale : 20 µg de p24 par ml d'antigène).

La technique d'immunodiffusion étant standardisée quant à l'antigène, le sérum de référence et la gélose ; nous avons déterminé la sensibilité relative du test par rapport au RIA et à l'EPI. Des corrélations ont été établies entre les titres des sérums décelés par chacun de ces tests. Une régression hautement significative a été d'abord obtenue entre les titres RIA et EPI. Ces méthodes apparaissent également sensibles et permettent la détection l'une comme l'autre de l'infection virale. Des corrélations hautement significatives ont été également obtenues entre d'une part ID et RIA et d'autre part ID et EPI. Les seuils de sensibilité de l'ID indiquent qu'un sérum peut être détecté lorsque son titre est au

moins égal à 583 par le RIA p24, 115 par le RIA gp51 ou 139 par l'EPI.

La régression RIA p24-RIA gp51 et la connaissance des seuils de sensibilité de l'ID par rapport à ces deux tests a permis de classer les sérums en 3 catégories. La majorité des sérums a présenté suffisamment d'anticorps dirigés contre la p24 et la gp51 pour être détectée en ID par l'un ou l'autre antigène (ID p24 ou ID gp51) ; un nombre plus restreint de sérums n'a pu être détecté que par l'un ou par l'autre antigène ; enfin, un nombre limité de sérums à faibles concentrations en anticorps n'a pas pu être détecté par l'ID. Il est donc nécessaire pour augmenter la sensibilité de l'ID, d'utiliser un antigène comportant les deux protéines virales p24 et gp51.

Dans le but d'apprécier la valeur pratique de l'ID, une enquête séroépidémiologique a été menée à l'aide de ces deux méthodes et les résultats ont été comparés. Etant donné que seuls les animaux à fort taux d'anticorps ont été détectés, il apparaît que l'ID est plus appropriée au dépistage des troupeaux infectés (détection de 60 % d'entre eux) qu'à la détection des cas individuels (détection de 22 % des animaux infectés).

L'enquête réalisée par Guillemain et al. (1978) dans les Landes montre que les animaux infectés tendent à présenter un accroissement de leur taux d'anticorps anti-BLV. On peut donc estimer que la réalisation répétée d'épreuves d'ID à quelques mois d'intervalle, permettrait de déceler les bovins développant une forte réponse immunitaire. Dans ces conditions, l'état d'infection d'un ensemble de troupeaux pourrait être établi.

De nombreux auteurs ont réalisé des programmes d'éradication de la leucose enzootique bovine en utilisant l'ID comme méthode de dépistage de l'infection par le BLV. Mammerickx et al. (1978) ont effectué des épreuves successives d'ID sur un petit nombre de troupeaux suivies de l'abattage de réagissants ; ils ont obtenu ainsi l'élimination complète de l'infection virale. Selon Forschner et al. (1978), la réalisation d'épreuves successives d'ID et l'élimination systématique des réagissants permettrait de faire disparaître l'infection virale dans 90 % des troupeaux.

Quelle que soit la méthode utilisée, ID ou méthodes plus sensibles telles que RIA ou EPI (voir dans l'avenir ELISA), une seule réponse sérologique négative ne signale pas l'absence d'infection virale ; il est bien connu en effet qu'une réponse immunitaire ne devient détectable qu'après un minimum de 15 jours suivant l'exposition à un antigène. Ainsi l'éradication du virus ne peut être obtenue que par élimination rapide des réagissants à chaque épreuve sérologique. Un cheptel ne peut être considéré indemne que si tous les animaux sont séronégatifs après une série de tests. Le nombre de tests nécessaires dépend de la sensibilité de la technique utilisée ; Ferrer (1979) montre que 2 tests RIA négatifs effectués à 3 mois d'intervalle, et en l'absence de tout contact avec un animal infecté, sont suffisants pour affirmer l'absence d'infection virale.

Il nous semble que la réalisation de 4 épreuves négatives d'ID, effectuées à 4 mois d'intervalle permettrait d'affirmer l'absence d'infection virale. A la suite de l'élimination d'un animal réagissant, un cheptel ne pourrait être considéré indemne qu'après 4 tests d'ID négatifs réalisés à 4 mois d'intervalle, chez tous les animaux. Tout animal introduit dans un cheptel devrait être mis en quarantaine et testé 2 fois à 3 mois d'intervalle à l'aide d'une méthode sensible (RIA - EPI) ou 4 fois à 4 mois

d'intervalle à l'aide de l'ID. Les problèmes et les coûts qu'entraineraient de telles précautions devraient faire porter le choix de l'achat sur des animaux en provenance de cheptels indemnes.

Un programme d'éradication devrait également prendre en compte le rôle que pourraient jouer les insectes vecteurs dans la transmission du BLV (moustiques, tiques et autres parasites hématophages). Toute intervention chirurgicale (castration, vaccination, écornage, prise de sang, injection...) devrait être réalisée avec du matériel stérile. Les machines à traire devraient être également soigneusement réglées afin d'éviter tout reflux de lait.

L'utilisation de l'insémination artificielle, à priori sans risque, devrait être conduite en l'absence de toute contamination : pus ou sang. Bien que le BLV ou les cellules infectées par le virus soient fréquemment présents dans le colostrum et le lait des vaches infectées, la transmission de la maladie par le lait ou le colostrum ne reste qu'occasionnelle ; les veaux nés de ces mères devront pourtant être isolés dès la naissance et allaités par des vaches non infectées. Par ailleurs, le fait de porter le colostrum à 56°C pendant 30 minutes permettrait de détruire le virus sans altérer les anticorps (Ferrer et Diglio, 1976 ; Diglio et Ferrer, 1976) et donc de protéger le veau de l'infection virale pendant les premiers mois de sa vie.

Il nous paraît donc possible d'éradiquer l'infection virale et par voie de conséquence la leucose enzootique bovine.

Puisque la majorité des animaux est infectée après la naissance, il serait d'un grand intérêt de mettre au point un vaccin. Cependant, la

présence d'anticorps anti-BLV chez les bovins ne s'oppose pas au développement de l'infection virale, il semble donc peu probable qu'un vaccin BLV soit d'une grande efficacité pour soustraire un animal à l'infection.

Si le modèle bovin est comparable à celui de la leucose féline, où un antigène viro-induit (FOCMA) est associé à l'expression tumorale, l'identification et la purification de celui-ci permettrait la réalisation d'un vaccin efficace.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire rapporteur

Professeur TOURNUT

Vu : Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

Vu : Le Président de la Thèse

Professeur MONNIER

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 23-3-1981
P/ LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
PAUL SABATIER, et par délégation
VICE-PRESIDENT,

UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE

Professeur L. LARENG

REFERENCES

BAUMGARTENER L.E., OLSON C., MILLER J.M. et VAN DER MAATEN M.J., (1975) ; Survey of antibodies to leukemia (C-type) virus in cattle. J. Amer. Vet. Med. Ass., 166, 249-251.

BENDIXEN H.J., (1963) ; Studies of leukosis enzootica bovis with special regard to diagnosis, epidemiology and eradication. Thèse, Copenhaguen.

BENDIXEN H.J., (1973) ; Epidemiologic studies of enzootic bovine leukosis associated with the public control program in Denmark, 1959-1971. Bibl. Haemat. 39, 215-219.

CORNEFERT-JENSEN Fr., STOCK N.D. et MARSHAK R.R., (1969) ; Detection of a bovine virus associated with syncytial formation in mixed cell cultures, Comparative Leukemia Research. Bibl. Haemat. 36, 453-464.

CRESPEAU F., SARSAT J.P., VUILLAUME A., LEVY D. et PARODI A.L., (1978) ; Etude séroépidémiologique sur l'état d'infection par le virus leucémogène bovin (BLV) pendant deux années consécutives dans une région à haute incidence du Sud-Ouest de la France. Ann. Rech. Vet., 9 (4), 747-754.

DESHAYES L., LEVY D., PARODI A.L. et LEVY J.P., (1977) ; Proteins of bovine leukemia virus. I. Characterization and reactions with natural antibodies. Journal of Virology, 21, 1056-1060.

DEVARE S.G., CHANDER S., SAMAGH B.S. et STEPHENSON J.R., (1977); Evaluation of radioimmunoprecipitation for the detection of bovine leukemia virus infection in domestic cattle. J. Immunol., 119, 277-282.

DEVARE S.G., STEPHENSON J.R., SARMA P.S. et AARONSON S.A., (1976); Bovine lymphosarcoma : development of a radioimmunologic technique for detection of the etiologic agent. Science, 194, 1428-1430.

DEVARE S.G. et STEPHENSON J.R., (1977); Biochemical and immunological characterization of the major envelope glycoprotein of bovine leukemia virus. J. Virol., 23, 443-447.

DIGLIO C.A. et FERRER J.F., (1976) ; Induction of syncytia by the bovine C-type leukemia virus. Cancer Res., 36, 1056-1067.

DRISCOLL D.M. et OLSON C., (1977); Bovine leukemia virus associated antigens in lymphocytes cultures. Amer. J. Vet. Res., 38, 1897-1898.

DUNGWORTH D.L., THEILEN G.H. et LENGYEL J., (1964); Bovine lymphosarcoma in California. II. The thymic form. Path. Vet., 1, 323-350.

DUTTA S.K., LARSON V.L., SORENSEN D.K., PERMAN V., WEBER A.F., HAMMER R.F. et SHOPE R.E., (1970) ; Isolation of C-type virus particles from leukemic and lymphocytotic cattle. Bibl. Haemat., 36, 548.

FERRER J.F., (1979); Bovine leukosis : Natural transmission and principles of control. JAVMA, 175 n° 12, 1281-1286.

FERRER J.F., ABT D.E., BHATT D.M. et MARSHAK R.R., (1974); Studies on the relationship between infection with bovine C-type virus, leukemia and persistent lymphocytosis in cattle. Cancer Res., 34, 893-900.

FERRER J.F., AVILA L. et STOCK N.D., (1972); Serological detection of type C viruses found in bovine cultures. Cancer Res., 32, 1864-1870.

FERRER J.F. et DIGLIO C.A., (1976) ; Development of an in vitro infectivity assay for the C-type bovine leukemia virus. Cancer Res., 36, 1068-1073.

FISCHINGER P.J., BLEVINS C.S. et NOMURA S., (1974); Simple quantitative assay for both xenotropic murine leukemia and ecotropic feline leukemia viruses. J. Virol., 14, 177-179.

FISHER R.A. et YATES F., (1963); Statistical tables for biological, agricultural and medical research (sixth edition), p. 63, J.W. ARROWSMITH Ltd., Bristol.

FORSCHNER Von E., EWALD P., KEYSERLINGK M.V., ROTTGEN W. et SEIDLER M.T., (1978); Nachweishaufigkeit von Leukose Antikorpern in Abhangigkeit zum Alter der Rinder. Berl., Munch Tierarzlt. Wschr 92 : 3-5, 1979. Methods : 91 : 453-456.

GREENWOOD F.C., HUNTER W.M. et GLOVER J.S., (1963); The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., 89, 114-123.

GUILLEMAIN B., MAMOUN R., ASTIER T., DUPLAN J.F. et PARODI A.L., (1978); Early polykaryocytosis inhibition test : Evaluation of its performance in a seroepidemiological survey of bovine leukemia virus induced antibodies in cattle. Ann. Rech. Vet., 9, 709-720.

GUILLEMAIN B., MAMOUN R., LEVY D., ASTIER T., IRGENS K. et PARODI A.L., (1978-A) ; Early polykaryocytosis inhibition : a simple quantitative in vitro assay for the detection of bovine leukemia virus infection in cattle. Europ. J. Cancer, 14, 811-827.

HOFF-JØRGENSEN R. et ESKILDSEN M., (1976) ; Demonstration of antibodies against bovine leukemia virus in bovine sera by complement fixation. Use of homologous complement component $C1_q$ and concentrated antigen in a direct test. In "Bovine Leukosis : various methods of molecular virology". A. Burny ed., E.E.C., Luxembourg, 179-190.

IRGENS K., PINELLI C., GUILLEMAIN B., LEVY D. et PARODI A.L., (1977); Early syncytium formation induced by BLV producing cells in mixed cultures. In : Bovine Leucosis : Various Methods of Molecular Virology, edited by A. Burny, pp. 311-322. Commission of European Communities, Luxembourg.

KAWAKAMI T.G., MOORE A.L., THEILEN G.M. et MUNN R.J., (1970) ; Comparison of virus-like particles from leukotic cattle to feline leukosis virus. Bibl. Haemat., 36, 471.

KESSLER S.W., (1975) ; Rapid isolation of antigen from cells with a staphylococcal protein A-antibody absorbent : parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. of Immunology, 115, 1617-1624.

LEVY D., DESHAYES L., GUILLEMAIN B. et PARODI A.L., (1977); Bovine leukemia virus specific antibodies among French cattle. I. Comparison of complement fixation and hematological tests. Int. J. Cancer, 19, 822-827.

LEVY D., DESHAYES L., PARODI A.L., LEVY J.P., STEPHENSON J.R., DEVARE S.G. et GILDEN R.V., (1977-A) ; Bovine leukemia virus specific antibodies among French cattle. II. Radioimmunoassay with the major structural protein (BLV p24). Int. J. Cancer, 20, 543-550.

LEVY D., GUILLEMAIN B., CHEVRIER L., BOIRON M. et PARODI A.L., (1975) ; Présence d'anticorps fixant le complément chez des bovins atteints de lymphocytose persistante. Résultats préliminaires concernant le cheptel bovin français. C.R. Acad. Sci. D, 280, 915-917.

MAMMERICKX M., CORMANN A., BURNY A., DEKEGEL D. et PORTETELLE D., (1978) ; Eradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the Gp Immunodiffusion test. Ann. Rech. Vet., 9, 885-894.

MAMMERICKX M., PORTETELLE D., KETTMANN R., GHYSDAEL J., BURNY A. et DEKEGEL D., (1976) ; Diagnostic tests of bovine leukemia. Comparison between an hematological test and the serological diagnosis. Europ. J. Cancer, 12, 433-439.

MAMMERICKX M., PORTETELLE D., KETTMAN R., GHYSDAEL J., BURNY A. et DEKEGEL D., (1976-A);Comparative study of two diagnostic methods of bovine leukosis : Hematology and Immunodiffusion. Vet. Microbiol., 1, 203-210.

McDONALD H.C. and FERRER J.F., (1976); Detection, quantitation and characterization of the major internal virion antigen of the bovine leukemia virus by radioimmunoassay. J. Natl. Cancer Inst., 57, 875-882.

MILLER J.M., MILLER L.D., OLSON C. et GILLETTE K.G., (1969); Virus like particles in phytohemagglutinine stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst., 43, 1297-1305.

MILLER J.M. et OLSON C., (1972); Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst., 49, 1459-1462.

MILLER J.M. et VAN DER MAATEN M.J., (1974); A complement fixation test for bovine leukemia (C-type) virus. J. Natl. Cancer Inst., 53, 1699-1702.

MILLER J.M. et VAN DER MAATEN M.J., (1976); Serologic detection of bovine leukemia virus infection. Vet. Microbiology, 1, 195-202.

MILLER J.M. and VAN DER MAATEN M.J., (1978); Attempts to control spread of bovine leukemia virus infection in cattle by serologic surveillance with the glycoprotein agar gel immunodiffusion test. In : The

Serological Diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis, edited by A.A. Ressang, pp. 127-135. Commission of European Communities, Luxembourg.

OLSON C., HOSS H.E., MILLER J.M. et BAUMGARTENER L.E., (1973) ; Evidence of bovine C-type (leukemia) virus in dairy cattle. J. Amer. Vet. Med. Ass., 163, 355-357.

PAULSEN J., BERTELSMANN K.F. et SCHLIESSER Th., (1975) ; Weitere Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen C-typ-Virus spezifisches Antigen in Seren vor Rindern aus leukose-verseuchten,-verdächtigen und -unverdächtigen Beständen. Zbl. Vet. Med. B., 22, 596-605.

PAULSEN J., KUWILSKY S. et SCHLIESSER Th., (1973) ; Antikörper gegen bovines und ovines C-typ-Virus-spezifisches Antigen in Seren von Rindern eines leukose-verseuchten Milchviehbestandes. Zbl. Vet. Med. B., 20, 696-700.

RESSANG A.A., MASTENBROEK N. et QUAK J., (1978) ; Studies on bovine leucosis. V. A comparative study on the practical value of the agar gel immunodiffusion test, the indirect fluorescent antibody technique and the micro complement fixation test for the detection of antibodies to bovine leucosis virus. Tijdschr. Diergeneeskd., 103 : 758-762 ; and In : The Serological Diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis, edited by A.A. Ressang, pp. 136-147. Commission of European Communities, Luxembourg.

RESSANG A.A., MASTENBROEK N., QUAK J., VAN GRIENSVEN L.J.L.D., CALAFAT J., HILGERS J., HAGEMAN P.C., SOUISSI T. et SWEN S., (1974); Studies on bovine leukemia. I. Establishment of type C virus producing cell lines. Zentralbl. Veterinaermed. (B), 21, 602-617.

SCHMIDT F.M. et HASSE G., (1968) ; Results of four years combat of bovine leukosis in the southern part of lower saxony. Proc. 3rd Int. Symp. Comp. Leukemia Res., Paris 1967 ; Bibl. Haemat., 31, 219-223.

SCHMIDT F.W., MITSCHERLICH E., FEIGE M. et ALBRECHT A., (1976); Relation of sporadic and enzootic cases of Bovine Leukosis to each other and the efficacity of the public health program to combate Bovine Leukosis in lower saxony. In : "Bovine Leukosis : various methods of molecular virology", A. Burny ed., E.E.C., Luxembourg, 371-381.

STRAUB O.C., LORENZ R.J., CHEVRIER L., DONNELLY W.J.C., FLENSBURG J.C., GENTILE G., MAMMERICKX M., MARKSON L.M. et RESSANG A.A., (1978); Bovine Hematology. Technical problems in the counting of leukocytes Zbl. Vet. Med. B, 25, 14-28.

VAN DER MAATEN M.J. et MILLER J.M., (1976); Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. Bibl. Haematol., 43, 360-362.

VAN DER MAATEN M.J. et MILLER J.M., (1978); Sites of in vivo replication of bovine leukemia virus in experimentally infected cattle. Ann. Rech. Vet., 9, 831-835.

VAN DER MAATEN M.J., MILLER J.M. et BOOTHE A.D., (1974); Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissue from cattle with lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst., 52, 491-497.

YALLOW R.S. et BERSONS A., (1960); Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest., 39, 1157.